



**Raquel Alexandra Rodrigues Amador**

Licenciada em Engenharia Biomédica

**Clonagem, sobre-expressão, purificação e  
caracterização bioquímica da proteína MreB de  
*Marinobacter hydrocarbonoclasticus***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Bioquímica

Orientadora: Doutora Susana Jorge Guerreiro Ramos,  
Investigadora de Pós-Doutoramento, FCT-UNL

Co-orientador: Doutor Rui Miguel Lourenço Rocha de Almeida,  
Investigador de Pós-Doutoramento, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares

Arguente: Prof. Doutor Manuel Aureliano Pereira Martins Alves

Vogal: Doutora Susana Jorge Guerreiro Ramos



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Novembro 2014**



**Raquel Alexandra Rodrigues Amador**

Licenciada em Engenharia Biomédica

**Clonagem, sobre-expressão, purificação e  
caracterização bioquímica da proteína MreB de  
*Marinobacter hydrocarbonoclasticus***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientadora: Doutora Susana Jorge Guerreiro Ramos,  
Investigadora de Pós-Doutoramento, FCT-UNL

Co-orientador: Doutor Rui Miguel Lourenço Rocha de Almeida,  
Investigador de Pós-Doutoramento, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares

Arguente: Prof. Doutor Manuel Aureliano Pereira Martins Alves

Vogal: Doutora Susana Jorge Guerreiro Ramos



**Novembro 2014**



# DIREITOS DE CÓPIA

**Clonagem, sobre-expressão, purificação e caracterização bioquímica da MreB de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus***

Copyright © Raquel Alexandra Rodrigues Amador, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Agradecimentos

A conclusão desta dissertação não teria sido possível sem o apoio e a preciosa ajuda de algumas pessoas às quais gostaria de expressar o meu agradecimento.

Em primeiro lugar, quero prestar o meu agradecimento, sincero e muito, mas mesmo muito especial à (Doutora) Susana Ramos que, para além de me ter orientado o projeto de licenciatura, quando lhe perguntei se me podia orientar a tese de mestrado não hesitou em dizer-me logo que havia trabalho para eu fazer. Muito obrigada por todos os conhecimentos que me transmitiste e que em muito contribuíram para o meu crescimento não só científico mas também pessoal. Muito obrigada pelas palavras de encorajamento, conselhos e, algumas vezes, “puxar de orelhas”, que às vezes também faz falta; muito obrigada por todo o tempo que “perdeste” comigo, pelo apoio e disponibilidade incondicional, pela compreensão e muita, mas mesmo muita, paciência que tiveste comigo. Muito obrigada pela preciosa ajuda e motivação que me deste para superar todas as dificuldades e desafios que encontrei durante a realização desta tese de mestrado. Muito obrigada pelas boleias, pelos almoços, lanches e jantares, pelas conversas, pelos desabafos e gargalhadas, pelos momentos divertidos, pelo carinho demonstrado, mas sobretudo, muito, mas mesmo muito obrigada por toda a amizade!

Mas também não posso deixar de agradecer de igual forma ao (Doutor) Rui Almeida, por tão bem me ter orientado esta tese, por muito me ter ajudado nas questões relacionadas com o RMN e não só; muito obrigada pelas palavras de incentivo, ajuda incondicional, apoio e compreensão, pelos conselhos e pela disponibilidade e muito obrigada por toda a paciência que tiveste comigo. Vocês os dois, Susana e Rui, são muito especiais para mim e por mais palavras que escreva nunca vou conseguir expressar o quanto vos estou grata e o quanto foram, e espero que continuem a ser, pessoas espetaculares para mim, e, por isso, mais uma vez repito, muito obrigada por tudo!

À professora Isabel Moura e ao professor José Moura, por me terem acolhido nos seus laboratórios, o que me permitiu dispor das melhores condições de trabalho e agradeço também a simpatia que sempre me dispensaram.

À professora Carla Carneiro por me ter levado a seguir este rumo. Foi a professora que fez com que crescesse em mim este “bichinho pela bioquímica”, se não tivesse escolhido a professora como co-orientadora no projeto final de licenciatura, provavelmente, neste momento, não estaria a enveredar por este caminho.

Não posso deixar de agradecer a todo o pessoal do Lab.617 que sempre me ajudou tanto no laboratório como muitas vezes noutra tipo de questões. Quero agradecer à Rute Nunes por toda a ajuda que me deu no laboratório, por todas as conversas, por ouvir muitos dos meus desabafos, por estar sempre disponível para me ajudar, pelos conselhos, pelas brincadeiras e

## Agradecimentos

---

por todos os momentos divertidos; à Cíntia Carreira, por toda a ajuda, pelas conversas, pelo apoio, pelas palavras de incentivo e também por todos os momentos divertidos que passámos no laboratório, principalmente naquelas alturas em que éramos as primeiras a chegar e, por vezes, as últimas a sair; à Cláudia Nóbrega pela disponibilidade e gosto em ajudar, por toda a paciência, boa disposição e por todo o carinho demonstrado; por último, e não menos importante, à Olga Mestre, de igual modo, por todas as conversas e conselhos, por toda a motivação e apoio, pelos momentos divertidos e pela tua simpatia. Quero agradecer também à Mariana Raposo, que apesar de não ter estado presente nos últimos momentos desta tese, ainda partilhámos alguns momentos engraçados no laboratório, e à Catarina Nunes, que apesar de não termos partilhado muitos momentos no laboratório, agradeço-te todas as dicas que me deste, o carinho demonstrado e a boa disposição. No geral, muito obrigada a todas pela vossa paciência, amizade, compreensão, apoio, ajuda incondicional, conselhos e, também, pelos ensinamentos que me transmitiram. Muito obrigada mesmo do fundo do coração, vocês são especiais para mim cada uma à sua maneira!

Quero agradecer também aos meus colegas de gabinete, Joana Sousa, Luís Fonseca, Francisco Oliveira, Ana Gonçalves e Lara Santos, e também ao restante pessoal do Lab.407, Célia Silveira, Patrícia Rodrigues, Ana Teresa Lopes, Luísa Maia e Tiago, por todas as gargalhadas, desabafos, pelo apoio, boa disposição e conselhos científicos.

Quero fazer um agradecimento sincero e especial à minha colega e amiga Joana Sousa que, desde que cheguei à FCT-UNL, sempre me acompanhou desde os primeiros dias do primeiro ano de mestrado e que até hoje nunca me abandonou, apesar dos momentos menos bons que passámos. Muito obrigada por todas as palavras que me disseste naqueles momentos em que eu mais precisava ouvir uma palavra amiga e por já me conheceres tão bem que já sabes quando estou bem ou mal. Muito obrigada por todo o teu apoio, pela ajuda e pelos conselhos, mas sobretudo, muito obrigada pela tua amizade e por seres tão especial para mim!

Quero também fazer um agradecimento especial aos meus familiares, pai, mãe, irmão, avó, avô e restantes, porque sem eles não seria possível chegar até aqui. Muito obrigada por todo o amor e carinho, por toda a paciência e compreensão que tiveram comigo e por todo o apoio incondicional, não só financeiro mas também emocional, embora muitas vezes fosse difícil entenderem o porquê de algumas coisas terem de ser assim nesta área. Muito obrigada por tudo!

Agradeço também a todos os meus amigos por me terem “aturado” nos momentos mais rabugentos nesta fase terminal deste ciclo de estudos, pelo apoio e motivação, e muito obrigada por compreenderem, por vezes, o motivo da minha ausência.



## Resumo

A actina, um componente central do citoesqueleto eucariótico, é responsável pela manutenção da forma celular, entre outras funções. Pensava-se que, em procariotas, este tipo de proteínas não existia, dado que estudos preliminares não haviam detectado elementos do citoesqueleto. No entanto, foram já identificadas homólogas estruturais e funcionais da actina em bactérias, nomeadamente a MreB, uma proteína do citoesqueleto de procariotas com uma estrutura helicoidal associada à membrana celular, envolvida na determinação da forma de células em bastonete. Com base nas características destas proteínas, supõe-se que a função biológica será semelhante à actina.

Neste trabalho, realizou-se a clonagem da MreB de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* no vetor de expressão pET-22b(+), sobre-expressão em meio LB (condições ótimas de crescimento: 37 °C, 190 rpm, indução a D.O.<sub>600 nm</sub> = 0,6 com 0,5 mM IPTG) e purificação através de centrifugações diferenciais e cromatografia de troca aniónica e filtração em gel. Determinou-se a massa molecular da proteína por filtração em gel (48 kDa) e gel de SDS-PAGE (42,48 kDa) e o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 27\,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), por espectroscopia de UV-Visível.

Os resultados obtidos por dispersão de luz permitem concluir que, à semelhança da MreB de outras bactérias, também a de *M. hydrocarbonoclasticus* tem a capacidade de polimerizar, sendo esta reação dependente da concentração de proteína e de KCl, ocorrendo apenas na presença de nucleótidos, com uma concentração crítica semelhante à MreB de *Thermotoga maritima* ( $\approx 3 \text{ nM}$ ). Verificou-se, ainda, que a velocidade de polimerização da MreB se ajusta a uma função sigmoidal descrita por  $v = \frac{0,0991}{1+10^{(2,4-[MreB]) \times 0,625}}$ .

Através da espectroscopia de RMN, determinou-se que o ATP e GTP interagem de maneira semelhante com a proteína, adotando estes uma conformação tal que se ligam através da pentose e do grupo  $-\text{NH}_2$  do anel de pirimidina; já o CTP ligar-se-á apenas através da pentose.

### Termos chave:

MreB ▪ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ▪ Homóloga ▪ Actina ▪ Polimerização ▪ Local de ligação de nucleótidos



## Abstract

Actin is a central component of the eukaryotic cytoskeleton, responsible for maintenance of cell shape, among other functions. It was thought that this protein was absent in prokaryotes, since preliminary studies had not detected cytoskeletal components in bacteria. However, structural and functional homologues of actin have been identified in bacteria, in particular MreB, a prokaryotic cytoskeletal protein with a helical structure associated with the cell membrane, involved in determining the shape of rod-shaped cells. Based on the characteristics of these proteins it is assumed they must have a similar biological function to actin.

In the present work, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* MreB was cloned into a pET-22b(+) expression vector, overexpressed in LB medium (optimal growth conditions: 37 °C, 190 rpm, induction at O.D.<sub>600 nm</sub> = 0.6 with 0.5 mM IPTG), and purified by differential centrifugation and anion exchange and gel filtration chromatography. The molecular weight of the protein was determined by gel filtration (48 kDa) and SDS-PAGE gel (42.48 kDa), and the molar extinction coefficient ( $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 27\,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) by UV-Visible spectroscopy.

The results obtained by light scattering suggest that, similar to MreB from other bacteria, *M. hydrocarbonoclasticus* MreB also has the capacity to polymerize, the reaction being dependent of protein and KCl concentrations, occurring only in the presence of nucleotides, and with a critical concentration similar to that of *Thermotoga maritima* MreB ( $\approx 3 \text{ nM}$ ). Furthermore, the rate of polymerization of MreB fits a sigmoidal function described by  $v = \frac{0.0991}{1+10^{(2.4-[MreB]) \times 0.625}}$ .

In addition, by NMR spectroscopy, it was determined that the mode of interaction of ATP and GTP with the protein is similar, by adopting a conformation such that they bind through the pentose and the -NH<sub>2</sub> group on the pyrimidine ring, unlike CTP which will bind only through the pentose.

### Keywords:

MreB ▪ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ▪ Homolog ▪ Actin ▪ Polymerization ▪ Nucleotide binding pocket



# Índice de Matérias

Agradecimentos.....	V
Resumo .....	vii
Abstract .....	ix
Índice de Figuras .....	xv
Índice de Tabelas .....	xxi
Lista de Abreviaturas.....	xxiii
Capítulo I     Introdução.....	1
I.1. A proteína MreB.....	1
I.1.1. A superfamília da actina .....	1
I.1.2. Enquadramento histórico .....	3
I.1.3. Caracterização .....	3
I.1.4. A polimerização da MreB: semelhanças com a actina e variabilidade inter-espécies ..	4
I.1.5. Funções e dinâmica intracelular dos filamentos de MreB .....	7
I.2. A bactéria <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> .....	10
I.3. A MreB de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> .....	11
I.4. Objetivo.....	12
Capítulo II     Materiais e Métodos .....	13
II.1. Reagentes.....	13
II.2. Procedimento experimental .....	13
II.2.1. Clonagem da MreB de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> .....	13
II.2.1.1. Alinhamento de sequências .....	13
II.2.1.2. Reação em Cadeia da Polimerase.....	14
II.2.1.3. Eletroforese em gel de agarose .....	16
II.2.1.4. Ligação entre o vetor pET-22b(+) e o fragmento de ADN de interesse .....	16
II.2.1.4.1. Reação de hidrólise do vetor pET-22b(+) e do fragmento de ADN de interesse (gene de MreB) com enzimas de restrição .....	17
II.2.1.4.2. Purificação do vetor pET-22b(+) e do fragmento de ADN de interesse .....	17
II.2.1.4.2.1. Purificação do vetor pET-22b(+) e do produto da reação de PCR.....	18
II.2.1.4.2.2. Purificação do ADN a partir do gel de agarose.....	18
II.2.1.4.3. Desfosforilação do vetor pET-22b(+). .....	19

II.2.1.5. Reação de ligação do fragmento de interesse digerido e purificado ao vetor pET-22b(+) digerido, purificado e desfosforilado .....	20
II.2.1.6. Preparação de meios de cultura .....	21
II.2.1.7. Transformação de células competentes .....	21
II.2.1.7.1. Obtenção de células competentes .....	21
II.2.1.7.2. Reação de Transformação .....	22
II.2.1.8. Isolamento de ADN plasmídico .....	24
II.2.2. Sobre-expressão da MreB de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> .....	25
II.2.2.1. Testes de expressão .....	25
II.2.2.2. Eletroforese de proteínas em géis de poliacrilamida .....	26
II.2.2.2.1. Eletroforese em condições desnaturantes .....	26
II.2.2.2.2. Revelação dos géis .....	26
II.2.3. Purificação da MreB de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> .....	26
II.2.3.1. Condições de Crescimento .....	26
II.2.3.2. Purificação da MreB .....	27
II.2.3.3 Quantificação da proteína .....	28
II.2.3.3.1. Método de Lowry .....	28
II.2.3.3.2. Método de BCA.....	29
II.2.4. Caracterização Bioquímica e Estrutural da MreB.....	30
II.2.4.1. Determinação do Coeficiente de Extinção Molar .....	30
II.2.4.2. Determinação da massa molecular.....	30
II.2.4.2.1. Cromatografia de Filtração em Gel.....	30
II.2.4.2.2. Gel de SDS-PAGE.....	31
II.2.4.3. Medição da polimerização de MreB por dispersão de luz .....	31
II.2.4.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H de MreB.....	32
II.2.4.5. Ensaio de Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de Transferência de Saturação .....	32
Capítulo III Resultados e Discussão .....	35
III.1. Clonagem, Sobre-expressão e Purificação da proteína MreB de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> .....	35
III.1.1. Alinhamento de sequências.....	35

III.1.2. Clonagem da sequência codificante da proteína MreB de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> no vetor de expressão pET-22b(+)	37
III.1.2.1. Obtenção do ADN da MreB com as zonas de restrição das enzimas <i>EcoRI</i> e <i>XhoI</i>	37
III.1.2.2. Ligação do fragmento de ADN da MreB ao vetor de expressão pET-22b(+)	41
III.1.2.3. Transformação de células <i>NovaBlue GigaSingles™</i> (Novagen) com o vetor pMreB – sequenciação do ADN inserido no vetor	44
III.1.3. Sobre-expressão e purificação da proteína MreB	46
III.1.3.1. Testes de sobre-expressão da proteína MreB	46
III.1.3.2. Purificação da proteína MreB	49
III.2. Caracterização bioquímica da proteína MreB	55
III.2.1. Determinação da massa molecular da MreB	55
III.2.1.1. Determinação por filtração em gel	55
III.2.2. Quantificação de proteína	58
III.2.3. Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta-Visível – determinação do coeficiente de extinção molar	60
III.3. Caracterização estrutural da proteína MreB de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	61
III.3.1. A polimerização de MreB de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	61
III.3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	68
Capítulo IV Conclusões e Perspetivas Futuras	75
Referências Bibliográficas	77
Anexos	85
Anexo I. Composição dos géis e soluções de eletroforese SDS-PAGE	85
Anexo II. Reagente de Biureto (Método de Lowry)	86





## Índice de Figuras

Figura I.1. Árvore filogenética da superfamília das proteínas homólogas bacterianas da actina. As subfamílias de actinas bacterianas têm sido identificadas com base na homologia da sequência. As subfamílias cuja polimerização foi demonstrada experimentalmente estão coloridas e identificadas. Adaptado de <sup>11</sup> .....2

Figura I.2. Comparação das estruturas cristalinas da actina eucariótica e da proteína bacteriana MreB. Os quatro subdomínios da actina são mostrados em diferentes cores e as mesmas cores são usadas para os domínios equivalentes da proteína bacteriana. Os rótulos de subdomínios convencionais da actina estão representados na estrutura da MreB. Adaptado de <sup>29</sup> .....4

Figura I.3. Comparação das estruturas tridimensionais da F-actina de *Saccharomyces cerevisiae* (código PDB: 1YAG) e da MreB de *T. maritima* (código PDB: 1JCE). As estruturas cristalinas da MreB contêm protofilamentos que são semelhantes a uma cadeia (protofilamento) da F-actina modelada. Adaptado de <sup>16</sup> .....5

Figura I.4. Representação esquemática da comparação simplificada de duas técnicas microscópicas usadas para visualizar a ultraestrutura e o movimento da MreB. A MreB (a castanho) é observada em ambos os casos, (a) e (b), acoplada à maquinaria de alongamento de peptidoglicano (PG) (a azul), que coletivamente representa as enzimas de síntese da parede celular e as proteínas que determinam a forma da célula. (a) representa o que se observa através de microscopia de fluorescência de desconvolução, onde as imagens obtidas através do corpo da célula descrevem uma MreB estruturada helicoidalmente. (b) através de TIRFM, uma técnica de alta resolução capaz de captar a superfície de um lado de uma bactéria e útil para a visualização de atividades na membrana, verificou-se que tanto a MreB como uma seleção de várias proteínas de alongamento de PG se movem em pequenos fragmentos, em oposição aos longos filamentos helicoidais com mobilidade bidirecional. As representações esquemáticas não se encontram à escala. Adaptado de <sup>72</sup> .....8

Figura I.5. Modelo para a interação de um filamento de MreB com a membrana. Na imagem é mostrado o *loop* de inserção na membrana necessário para a *TmMreB* (à direita) bem como a hélice anfipática N-terminal da *EcMreB* (à esquerda). Adaptado de <sup>73</sup> .....9

Figura I.6. Imagem de microscopia eletrônica da *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*<sup>84</sup> ..... 10

Figura I.7. Sobreposição estrutural da actina (código PDB: 1J6Z, a azul) e da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* (do modelo por homologia, a creme), com um *RMSD* de 1,22 Å. Ambas as proteínas partilham a mesma topologia, arquitetura de quatro domínios e a maior parte dos resíduos envolvidos na ligação ao ATP e magnésio. O modelo foi criado utilizando a plataforma *online I-Tasser* e a sobreposição das estruturas utilizando o programa *UCSF Chimera*. ..... 12

Figura III.1. Sequência primária em aminoácidos da proteína MreB de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. A sequência foi obtida através da base de dados da *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) .....35

Figura III.2. Alinhamento das sequências em resíduos de aminoácidos da MreB de várias bactérias, através do programa informático *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). As sequências foram obtidas através da base de dados da *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). .....36

Figura III.3. Alinhamento das sequências em aminoácidos correspondentes à proteína MreB da bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* e à  $\alpha$ -actina de músculo-esquelético humano (*Homo sapiens*), através do programa informático *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). As sequências foram obtidas através da base de dados da *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). .....37

Figura III.4. Representação esquemática do vetor de expressão pET-22b(+) com o fragmento de ADN da MreB inserido no mesmo (representado a vermelho) entre o local de restrição das enzimas *EcoRI* e *XhoI*. A imagem foi reproduzida utilizando o *software* *BVTech Plasmid*. .....38

Figura III.5. Gel de agarose (0,8%) correspondente aos produtos das reações de PCR utilizada para amplificação da MreB de <i>M.hydrocarbonoclasticus</i> . As reações foram realizadas com e sem adição de 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> ( <i>GE Healthcare</i> ), à esquerda e direita do marcador de massas moleculares (M) ( <i>Fermentas</i> ), respetivamente. Utilizou-se ADN genómico (a) e (c) ou uma colónia de <i>M.hydrocarbonoclasticus</i> (b) e (d) como ADN molde, tendo sido utilizados 0,2 mM dNTP's, 1 µM <i>primers</i> e a enzima <i>Taq DNA Polymerase</i> (V <sub>f</sub> = 25 µL, em solução tampão 1x conc.). Em todos os casos, foram adicionados 5 µL de amostra e 5 µL de tampão de amostra. A eletroforese decorreu a 100 V, durante aproximadamente 20 minutos. ....	39
Figura III.6. Gel de agarose (0,8%) correspondente ao produto da reação de PCR utilizada para amplificação da MreB de <i>M.hydrocarbonoclasticus</i> . (a) A reação foi realizada utilizando 0,2 mM dNTP's, 1 µM <i>primers</i> , 1 colónia de <i>M.hydrocarbonoclasticus</i> e a enzima <i>HF Taq DNA Polymerase</i> (V <sub>f</sub> = 50 µL em solução tampão 1x conc.), (M) marcador de massas moleculares ( <i>Fermentas</i> ). Aplicaram-se 5 µL de cada amostra (a) e (M), às quais se adicionou 5 µL de tampão de amostra. A eletroforese decorreu durante aproximadamente 20 minutos, a 100 V. ....	40
Figura III.7. Gel de agarose (0,8%) correspondente à purificação do fragmento de ADN codificante da proteína MreB (a); (M) Marcador de massas moleculares ( <i>Fermentas</i> ). Aplicaram-se 5 µL de cada amostra às quais se adicionou 5 µL de tampão de amostra. A eletroforese decorreu durante aproximadamente 20 minutos, a 100 V. ....	40
Figura III.8. Gel de agarose (0,8%) correspondente à amostra recolhida após a purificação do produto da reação de hidrólise do fragmento de ADN de interesse com as enzimas de restrição <i>EcoRI</i> e <i>XhoI</i> . (M): 5 µL marcador de massas moleculares ( <i>Fermentas</i> ); (a): 5 µL de amostra composta por 20 µL do fragmento de ADN de interesse, 5 µL da Solução Tampão <i>REact</i> ® 2, 1 µL da enzima <i>EcoRI</i> e 1 µL da enzima <i>XhoI</i> , após purificação. Em todos os poços foram também adicionados 5 µL de tampão de amostra. Os componentes utilizados na reação de hidrólise encontram-se descritos na secção II.2.1.4.1. dos Materiais e Métodos. ....	41
Figura III.9. Gel de agarose (0,8%) correspondente à amostra recolhida após a purificação da banda correspondente ao produto da purificação da reação de hidrólise do fragmento de ADN de interesse com as enzimas de restrição <i>EcoRI</i> e <i>XhoI</i> . (M): 5 µL do marcador de massas moleculares ( <i>Fermentas</i> ); (a): 5 µL de amostra após purificação da banda do gel de agarose. Em todos os poços foram também adicionados 5 µL de tampão de amostra. A eletroforese decorreu a 100 V durante aproximadamente 20 minutos. ....	42
Figura III.10. Gel de agarose (0,8%) do (a) produto resultante da reação de ligação do fragmento de ADN da MreB ao vetor pET-22b(+), após digestão e purificação dos mesmos, e (M): Marcador de massas moleculares ( <i>Fermentas</i> ). Em ambos os casos, foram adicionados 5 µL da amostra e 5 µL do tampão de amostra. A eletroforese decorreu durante aproximadamente 20 minutos, a 100 V. ....	43
Figura III.11. Gel de agarose (1%) da reação de hidrólise do produto da ligação entre o vetor pET-22b(+) e o ADN codificante da proteína MreB com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>XhoI</i> (1 hora e 30 minutos, 37 °C) (10 µL de amostra (a)). (M): 5 µL do marcador de massas moleculares ( <i>Fermentas</i> ). Em ambas as amostras foram também adicionados 5 µL de tampão de amostra. Os componentes utilizados na reação de hidrólise encontram-se descritos na secção II.2.1.4.1. dos Materiais e Métodos. A eletroforese decorreu durante aproximadamente 20 minutos, a 100 V. ....	43
Figura III.12. Esquema ilustrativo da região de clonagem do vetor pET-22b(+), onde se encontra inserido o fragmento de ADN da MreB, com indicação do promotor T7 e dos <i>primers</i> <i>T7 promoter primer</i> e <i>T7 terminator primer</i> , a partir dos quais foi possível obter as sequências em nucleótidos MreB_T7FWD e MreB_T7RVS, respetivamente. ....	44
Figura III.13. Alinhamento das sequências em resíduos de aminoácidos da proteína MreB da bactéria <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> e da sequência MreB_T7FWD, que corresponde à tradução para resíduos de aminoácidos da sequência em nucleótidos do fragmento de ADN da MreB clonado no vetor pET-22b(+), tendo sido utilizado pelos serviços da empresa <i>StabVida</i> o <i>primer T7 promoter primer</i> . O alinhamento destas sequências em resíduos de aminoácidos foi obtido através do programa informático <i>ClustalW2</i> ( <a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a> ) e a sequência da MreB de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> foi obtida através da base de dados da <i>National Center for Biotechnology Information</i> ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> ). ....	45
Figura III.14. Alinhamento das sequências em resíduos de aminoácidos da proteína MreB da bactéria <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> e da sequência MreB_T7RVS, que corresponde à tradução para resíduos de aminoácidos da sequência em nucleótidos do fragmento de ADN da MreB clonado no vetor	

pET-22b(+), tendo sido utilizado pelos serviços da *Stabvida* o *primer T7 promoter primer*. O alinhamento destas sequências em resíduos de aminoácidos foi obtido através do programa informático *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e a sequência da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* foi obtida através da base de dados da *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).  
..... 46

Figura III.15. Gráfico da densidade ótica a 600 nm ( $D.O._{600\text{ nm}}$ ) em função do tempo (em horas) antes e após indução com IPTG, a 25 e 37 °C, respetivamente. As culturas celulares foram induzidas com 0; 0,1; 0,5; 1 mM IPTG (representado a azul, vermelho, verde e roxo, respetivamente) quando a  $D.O._{600\text{ nm}} \approx 0,6$  (assinalado com uma seta preta).  
..... 47

Figura III.16. Gráfico da densidade ótica a 600 nm ( $D.O._{600\text{ nm}}$ ) em função do tempo (em horas) antes e após indução IPTG, a 25 e 37 °C, respetivamente. As culturas celulares foram induzidas com 0; 0,1; 0,5; 1 mM IPTG (representado a azul, vermelho, verde e roxo, respetivamente) quando a  $D.O._{600\text{ nm}} \approx 1,5$  (assinalado com uma seta preta).  
..... 47

Figura III.17. Géis de SDS-PAGE (12,5% acrilamida) das amostras recolhidas em cada instante (3, 5, 7 e 18 horas, respetivamente) após indução com 0 mM (a-d), 0,1 mM (e-h), 0,5 mM (i-l) e 1 mM IPTG (m-p), a (i) 25 °C e (ii) 37 °C. (M) Marcador de massas moleculares. O retângulo laranja indica a zona entre as bandas do marcador correspondentes a 35 e 45 kDa, entre as quais se encontra a banda correspondente à proteína MreB. A eletroforese decorreu a 150 V, durante, aproximadamente, 1 hora.  
..... 48

Figura III.18. Curva de crescimento de bactérias *One Shot® BL21(DE3)* transformadas com o vetor pMreB. Representação gráfica da densidade ótica a 600 nm ( $D.O._{600\text{ nm}}$ ) (A) e do logaritmo da  $D.O._{600\text{ nm}}$  (B) em função do tempo de crescimento (em horas) antes e após indução (assinalada com uma seta azul escura) com 0,5 mM IPTG, a 37 °C. A tracejado está indicado o início da fase estacionária (fase II).  
..... 50

Figura III.19. Esquema ilustrativo do processo de purificação da MreB a partir de uma cultura celular de 6 L até à proteína pura.  
..... 51

Figura III.20. Cromatograma da primeira etapa da purificação, cromatografia de permuta aniônica (matriz *DEAE FF*) do extrato citoplasmático proveniente de um crescimento de 6 L de células BL21 transformadas com o plasmídeo pMreB. A vermelho está representada a  $Abs_{280\text{ nm}}$  (eixo vertical principal), a azul o gradiente salino entre 0 – 500 mM NaCl em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $CaCl_2$  (eixo vertical secundário), ambos representados em função do volume (em mL) de 20 mM Tris-HCl pH 7,6 e 0,2 mM  $CaCl_2$ . A MreB começou a ser eluída a, aproximadamente, 275 mL de NaCl (55% da concentração máxima de NaCl).  
..... 52

Figura III.21. Gel de SDS-PAGE (12,5% acrilamida) das frações (a-o) recolhidas após cromatografia de troca aniônica (coluna *DEAE FF*); (M) marcador de massas moleculares (*Thermo scientific*). No retângulo laranja estão identificadas as frações com maior expressão da proteína MreB. A eletroforese foi realizada a 150 V durante aproximadamente 1 hora.  
..... 53

Figura III.22. Cromatograma da última etapa da purificação, cromatografia de filtração em gel (matriz *Superdex 75*), da fração da MreB concentrada obtida após a etapa anterior. A amostra foi eluída em 20 mM Tris-HCl pH 7,6 e 0,2 mM  $CaCl_2$  e a absorvância foi monitorizada a 280 nm (representado a vermelho). A azul está indicado o pico máximo de absorvância correspondente à MreB com menos contaminantes presentes em solução.  
..... 53

Figura III.23. Gel de SDS-PAGE (12,5% acrilamida) das frações (a-n) recolhidas após cromatografia de filtração em gel (coluna *Superdex 75*); (M) marcador de massas moleculares (*Thermo scientific*). No retângulo laranja estão identificadas as frações que continham a MreB praticamente pura. A eletroforese foi realizada a 150 V durante aproximadamente 1 hora.  
..... 54

Figura III.24. Gel de SDS-PAGE (12,5% acrilamida) de todo o processo de purificação da proteína MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* desde a cultura celular de 6 L até à MreB pura. (a) Fração recolhida após o crescimento da cultura celular; (b) fração solúvel recolhida após ultracentrifugação; (M) marcador de massas moleculares; (c) fração concentrada recolhida após coluna *DEAE FF*; (d) fração concentrada recolhida após coluna *Superdex 75*. No retângulo vermelho está identificada a abanda correspondente à MreB em todos os passos realizados. A eletroforese foi realizada a 150 V durante aproximadamente 1 hora.  
..... 55

Figura III.25. Cromatograma obtido para curva de calibração da cromatografia de exclusão molecular ( <i>Superdex 200 10/300 GL</i> ). No cromatograma estão representadas as absorvâncias ao comprimento de onda de 280 nm das proteínas padrão (preto) e da MreB (vermelho), ambas em função do volume de eluição ( $V_e$ , em mL), onde Fer – Ferritina, Ald – Aldolase, CA – Conalbumina, OA – Ovalbumina e RibA – Ribonuclease A. No canto superior direito está representada a reta de calibração do coeficiente de distribuição ( $K_{av}$ ) ( $V_0 = 7,98$ mL e $V_t = 24$ mL), em função do logaritmo das massas moleculares (log (MM)). Os círculos pretos sem preenchimento representam os padrões e o círculo vermelho com preenchimento a MreB.....	56
Figura III.26. Reta de calibração do logaritmo das massas moleculares (log (MM)) das proteínas padrão em função da distância de migração relativa no gel ( $R_f$ ).....	57
Figura III.27. Retas de calibração obtidas pelo método de Lowy e pelo método de BCA, utilizando amostras de BSA de concentração conhecida. ....	59
Figura III.28. Espectro de UV-Vis de 556 $\mu$ M MreB em 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,2 mM $CaCl_2$ e 0,2 mM ATP, com destaque do pico correspondente ao ATP ( <i>inset</i> ). ....	60
Figura III.29. Determinação do coeficiente de extinção molar da proteína MreB em tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,2 mM $CaCl_2$ e 0,2 mM ATP. No canto superior direito está representada a reta de calibração das absorvâncias obtidas a 280 nm em função das diferentes concentrações de MreB. ....	61
Figura III.30. Dependência da concentração da MreB de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> . Intensidade da dispersão de luz em função do tempo (em segundos) de polimerização da MreB, em condições padrão (20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM $CaCl_2$ ), para diferentes concentrações de MreB. A polimerização foi iniciada pela adição de 2 mM $MgCl_2$ , 2 mM ATP e 50 mM KCl, 200 segundos após o início dos ensaios (assinalado com uma seta preta). Os ensaios de dispersão de luz foram monitorizados a 90° em relação à luz incidente, num espectralfluorímetro com ambos os monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção II.2.4.3. dos Materiais e Métodos. ....	62
Figura III.31. Determinação da concentração crítica da MreB de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> . Intensidade da dispersão de luz em função da concentração da MreB, em condições padrão (2 mM $MgCl_2$ , 2 mM ATP e 50 mM KCl em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM $CaCl_2$ ), monitorizada a 90° em relação à luz incidente, num espectralfluorímetro com ambos os monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção II.2.4.3. dos Materiais e Métodos. ....	63
Figura III.32. Velocidade de polimerização em função da concentração de MreB de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> em condições padrão (2 mM $MgCl_2$ , 2 mM ATP e 50 mM KCl em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM $CaCl_2$ ). ....	64
Figura III.33. Dependência da concentração de KCl. Intensidade da dispersão de luz em função do tempo (em segundos) de polimerização da MreB de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> , em condições padrão (4 $\mu$ M MreB em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM $CaCl_2$ ), para diferentes concentrações de KCl. A polimerização foi iniciada pela adição de 2 mM $MgCl_2$ , 2 mM ATP e 0 – 200 mM KCl, 200 segundos após o início dos ensaios (assinalado com uma seta preta). Os ensaios de dispersão de luz foram monitorizados a 90° em relação à luz incidente, num espectralfluorímetro com ambos os monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção II.2.4.3. dos Materiais e Métodos.....	65
Figura III.34. Dependência da concentração de ATP. Intensidade da dispersão de luz em função do tempo (em segundos) de polimerização da MreB de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> , em condições padrão (4 $\mu$ M MreB em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM $CaCl_2$ ), para diferentes concentrações de ATP. A polimerização foi iniciada pela adição de 2 mM $MgCl_2$ , 50 mM KCl e 0 – 4 mM ATP, 200 segundos após o início dos ensaios (assinalado com uma seta preta). Os ensaios de dispersão de luz foram monitorizados a 90° em relação à luz incidente, num espectralfluorímetro com ambos os monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção II.2.4.3. dos Materiais e Métodos.....	67
Figura III.35. Espectro de $^1H$ -RMN da molécula de ATP (Adenosina-5'-Trifosfato) em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM $CaCl_2$ . A atribuição de ressonâncias encontra-se de acordo com o descrito na base de dados SDBS ( <i>Spectral Database for Organic Compounds</i> ). No <i>inset</i> encontra-se representada a molécula de ATP com indicação dos prótons que correspondem às ressonâncias atribuídas no espectro. Os espectros foram adquiridos a 25 °C num espectralfluorímetro <i>Bruker Avance III</i> 400 MHz equipado com uma unidade de controlo da temperatura. Acumularam-se 16 <i>scans</i> por espectro, com um tempo de espera de 1,5 s entre <i>scans</i> , de acordo com o descrito na secção II.2.4.4. dos Materiais e Métodos. ....	68

Figura III.36. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da molécula de CTP (Citosina-5'-Trifosfato) em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ . A atribuição de ressonâncias encontra-se de acordo com o descrito na base de dados *SDBS* (*Spectral Database for Organic Compounds*). No *inset* encontra-se representada a molécula de CTP com indicação dos prótons que correspondem às ressonâncias atribuídas no espectro. Os espectros foram adquiridos a 25 °C num espectrómetro *Bruker Avance III* 400 MHz equipado com uma unidade de controlo da temperatura. Acumularam-se 16 *scans* por espectro, com um tempo de espera de 1,5 s entre *scans*, de acordo com o descrito na secção II.2.4.4. dos Materiais e Métodos. .... 69

Figura III.37. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da molécula de GTP (Guanosina-5'-Trifosfato) em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ . A atribuição de ressonâncias encontra-se de acordo com o descrito na base de dados *SDBS* (*Spectral Database for Organic Compounds*). No *inset* encontra-se representada a molécula de GTP com indicação dos prótons que correspondem às ressonâncias atribuídas no espectro. Os espectros foram adquiridos a 25 °C num espectrómetro *Bruker Avance III* 400 MHz equipado com uma unidade de controlo da temperatura. Acumularam-se 16 *scans* por espectro, com um tempo de espera de 1,5 s entre *scans*, de acordo com o descrito na secção II.2.4.4. dos Materiais e Métodos. .... 69

Figura III.38. Espectro de RMN-STD da molécula de ATP em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ . A azul está representado o espectro *on-resonance*, a vermelho o espectro *off-resonance* e a preto o espectro da diferença. A razão  $[\text{ATP}]/[\text{MreB}]$  é igual a 1000. No espectro estão indicadas com uma seta preta as ressonâncias que sofreram maior efeito de RMN-STD. Os dados de RMN-STD foram adquiridos a 25 °C num espectrómetro *Bruker Avance III* 400 MHz equipado com uma unidade de controlo da temperatura, tendo-se acumulado 16 *scans* por espectro. A saturação foi conseguida através da aplicação de uma série de pulsos Gaussianos de 90° com a frequência especificada (2,94 ppm, *on-resonance* ou 25 ppm, *off-resonance*) com uma duração total de 2 segundos, de acordo com o descrito na secção II.2.4.5. dos Materiais e Métodos. .... 71

Figura III.39. Espectro de RMN-STD da molécula de CTP em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ . A azul está representado o espectro *on-resonance*, a vermelho o espectro *off-resonance* e a preto o espectro da diferença. A razão  $[\text{CTP}]/[\text{MreB}]$  é igual a 1000. No espectro está indicada com uma seta a ressonância que sofreu maior efeito de RMN-STD. A saturação foi conseguida através da aplicação de uma série de pulsos Gaussianos de 90° com a frequência especificada (2,94 ppm, *on-resonance* ou 25 ppm, *off-resonance*) com uma duração total de 2 segundos, de acordo com o descrito na secção II.2.4.5. dos Materiais e Métodos. .... 72

Figura III.40. Espectro de RMN-STD da molécula de GTP em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ . A azul está representado o espectro *on-resonance*, a vermelho o espectro *off-resonance* e a preto o espectro da diferença. A razão  $[\text{GTP}]/[\text{MreB}]$  é igual a 1000. No espectro estão indicadas com uma seta as ressonâncias que sofreram maior efeito de RMN-STD. A saturação foi conseguida através da aplicação de uma série de pulsos Gaussianos de 90° com a frequência especificada (2,94 ppm, *on-resonance* ou 25 ppm, *off-resonance*) com uma duração total de 2 segundos, de acordo com o descrito na secção II.2.4.5. dos Materiais e Métodos. .... 73



## Índice de Tabelas

Tabela II.I. Características dos *primers* utilizados nas reações de PCR. MM – Massa Molecular, T<sub>m</sub> – Temperatura de *melting* (fusão), % GC e µg/100µM. .... 15

Tabela II.II. Composição das reações de PCR utilizadas para amplificação do gene de MreB do genoma de *M. hydrocarbonoclasticus*. Solução Tampão com 15 mM MgCl<sub>2</sub> (10x conc.; *GE Healthcare*), usada para a enzima *Taq DNA Polymerase* ou Solução Tampão com 12,5 mM MgCl<sub>2</sub> (5x conc.; *Roche*), usada para a enzima *High Fidelity Taq DNA Polymerase*; dNTP's (onde N = C, T, G ou A; [dNTP's]<sub>stock</sub> = 2,5 mM); *primers* MreB\_FWD e MreB\_RVS ([*primers*]<sub>stock</sub> = 10 µM); MgCl<sub>2</sub> ([MgCl<sub>2</sub>]<sub>stock</sub> = 25 mM); e ADN polimerase (*Taq* ou *HF Taq*; 5 U/µL). O volume final para a reação com a *Taq* e respetivo tampão e para os testes com MgCl<sub>2</sub> e ADN genómico foi de 25 µL e para a reação com a *HF Taq* foi de 50 µL. O volume de dNTP's e de *primers* das reações com um volume final de 25 ou 50 µL, é apresentado à esquerda e à direita da barra, respetivamente. .... 15

Tabela II.III. Programa de amplificação utilizado em todas as reações de PCR descritas ao longo do presente trabalho. Passo 1 – Desnaturação inicial; 2 – Desnaturação; Passo 3 – Hibridação; Passos 4 – Extensão; 6 – Extensão final. .... 15

Tabela II.IV. Reação de hidrólise do vetor pET-22b(+) e do fragmento de ADN de interesse com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* (10 U/µL; *Invitrogen*) em solução tampão *REact® 2* (10x conc.; *Invitrogen*). .... 17

Tabela II.V. Reação de desfosforilação do vetor pET-22b(+) digerido e purificado, utilizando a enzima fosfatase alcalina (1 U/µL; *Promega*) e a solução tampão de desfosforilação (10x conc.; *Promega*). ..... 19

Tabela II.VI. Reação de ligação do fragmento de ADN de MreB digerido e purificado ao vetor pET-22b(+) digerido, purificado e desfosforilado em solução tampão de diluição de ADN (5x conc.; *Roche*), à qual foi, posteriormente, adicionada a enzima *T4 DNA Ligase* (5 U/µL; *Roche*) e a respetiva solução tampão de ligação (2x conc.; *Roche*). .... 20

Tabela II.VII. Reação de hidrólise do ADN plasmídico do fragmento de interesse inserido no vetor pET-22b(+) com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* (10 U/µL; *Fermentas*) e a solução tampão *Tango* (2x conc.; *Thermo Scientific*) de modo a verificar a correta inserção do fragmento de ADN de interesse no vetor. .... 21

Tabela II.VIII. Proteínas do *kit* de calibração de filtração em gel (*HMW* e *LMW* da *GE Healthcare*), utilizadas para obtenção da reta de calibração para determinação da massa molecular aparente da MreB. .... 30

Tabela III.I. Sequências em nucleótidos do fragmento de ADN da proteína MreB, clonado no vetor pET-22b(+), obtidas pela *StabVida* utilizando os *primers* *T7 promoter primer* e *T7 terminator primer*, tendo sido atribuída a estas a designação de MreB\_T7FWD e MreB\_T7RVS, respetivamente, após a sequenciação do plasmídeo pMreB. .... 44

Tabela III.II. Valores utilizados na determinação da massa molecular aparente da MreB. Sendo que V<sub>t</sub> = 24 mL, V<sub>0</sub> = 7,98 mL e que a equação da reta corresponde a K<sub>av</sub> = - 0,2733 (log (MM)) + 1,71. .... 56

Tabela III.III. Comparação entre os dois métodos de determinação da massa molecular da MreB utilizados (determinação por filtração em gel e por gel de SDS-PAGE). .... 57

Tabela III.IV. Concentração da proteína total na amostra de através do método de *Lowry* e do método de *BCA*. .... 59

Tabela A.I.I. Composição quantitativa dos géis de poliacrilamida 12,5% (m/V) em solução tampão Tris-Tricina. O Persulfato de amónia (PSA, *Sigma-Aldrich®*) e o TEMED (do inglês, *Tetramethylethylenediamine*, com a fórmula (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, *Merk*), são adicionados imediatamente antes de colocar a solução no suporte de vidro, para evitar a polimerização antes da aplicação da solução do gel no local adequado. As soluções para realização de géis são guardadas a 4 °C, à exceção do PSA, que é conservado a -20 °C. O *stock* da mistura de Acrilamida/Bisacrilamida tem

## Índice de Tabelas

---

uma percentagem diferente para o gel de separação e concentração, 41,5% / 1,5% (m/V) e 48% / 1,5% (m/V), respetivamente.....85

Tabela AI.II. Composição quantitativa da solução aquosa do tampão de amostras para eletroforese SDS-PAGE. Os volumes apresentados são para um  $V_{\text{total}}$  de 20 mL. ....85

Tabela AI.III. Composição quantitativa da solução corante para géis de SDS-PAGE.  $V_{\text{final}} = 250$  mL (em  $\text{H}_2\text{O}$ ). ....85

Tabela AII.I. Composição e modo de preparação da solução do reagente de Biureto para o método de quantificação da proteína através do método de *Lowry*.....86



## Lista de Abreviaturas

**A** – Adenina

**Abs** – Absorvância

**ADN** – Ácido Desoxirribonucleico

**ADP** – Adenosina-5'-Difosfato

**Amp** – Ampicilina

**ARN** – Ácido Ribonucleico

**ARNm** – Ácido Ribonucleico mensageiro

**ARNr 16S** – Ácido Ribonucleico correspondente à cadeia 16S do ribossoma

**ATCC** – *American Type Culture Collection*

**ATP** – Adenosina-5'-Trifosfato

**B.** – *Bacillus*

**BCA** – Ácido Bicinconínico

**bp** – pares de bases

**BSA** – Albumina de Soro Bovino (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)

**C** – Citosina

**c.d.o.** – Comprimento de onda

**cfu** – unidades formadoras de colônias (do inglês, *colony-forming unit*)

**C-terminal** – Zona Carboxilo terminal de uma cadeia polipeptídica

**CTP** – Citosina-5'-Trifosfato

**Da** – Dalton

**DEAE** – Dietilaminoetil

**Ø** – Diâmetro

**dNTP's** – desoxinucleótidos trifosfatados (N = Adenina, Citosina, Guanina ou Timina)

**D.O.** – Densidade Ótica

**ε** – Coeficiente de extinção molar

**ECT** – Criotomografia Eletrônica (do inglês, *Electron CryoTomography*)

**EDTA** – Ácido Etilenodiaminotetracético

**E.** – *Escherichia*

## Lista de Abreviaturas

---

**F-actina** – Actina Filamentosa

**FID** – *Free-Induction Decays*

**FWD** – *Forward*

**g** – aceleração da gravidade

**G** – Guanina

**G-actina** – Actina Globular

**GFP** – Proteína Verde Fluorescente (do inglês, *Green Fluorescent Protein*)

**GTP** – Guanosina-5'-Trifosfato

**His** – Histidina

**HMW** – *High Molecular Weight*

**HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*)

**IPTG** – Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosídeo

**K<sub>av</sub>** – Coeficiente de distribuição

**LMW** – *Low Molecular Weight*

**M.** – *Marinobacter*

**min** – minutos

**MM** – Massa Molecular

**MWCO** – *Molecular Weight Cut-Off*

**N-terminal** – Zona Amino terminal de uma cadeia polipeptídica

**NCBI** – *National Center for Biotechnology Information*

**PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

**PDB** – *Protein Data Bank*

**PG** – Peptidoglicano

**pI** – ponto Isoelétrico

**ppm** – partes por milhão

**Ps.** – *Pseudomonas*

**PSA** – Persulfato de Amônia

**R<sub>f</sub>** – distância de migração relativa

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**RMSD** – *Root Mean Square Deviation*

**rpm** – rotações por minuto

**RVS** – *Reverse*

**seg** – *segundos*

**SDS-PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

**STD** – Diferença de Transferência de Saturação (do inglês, *Saturation-Transfer Difference*)

**T.** – *Thermotoga*

**T** – Timina

**TIRFM** – Microscopia de Fluorescência de Reflexão Interna Total (do inglês, *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*)

**TEMED** – *N,N,N',N'*-Tetrametiletilenodiamina

**UA** – Unidades Arbitrárias

**UV** – Ultravioleta

**V<sub>e</sub>** – Volume de eluição

**V<sub>0</sub>** – Volume “morto”

**V<sub>t</sub>** – Volume total



# Capítulo I Introdução

## I.1. A proteína MreB

### I.1.1. A superfamília da actina

A actina é uma das proteínas mais abundantes e altamente conservada encontrada em todas as células eucarióticas com papéis muito diversificados nos processos centrais, como a manutenção da forma da célula, a mobilidade e a citocinese<sup>1,2</sup>.

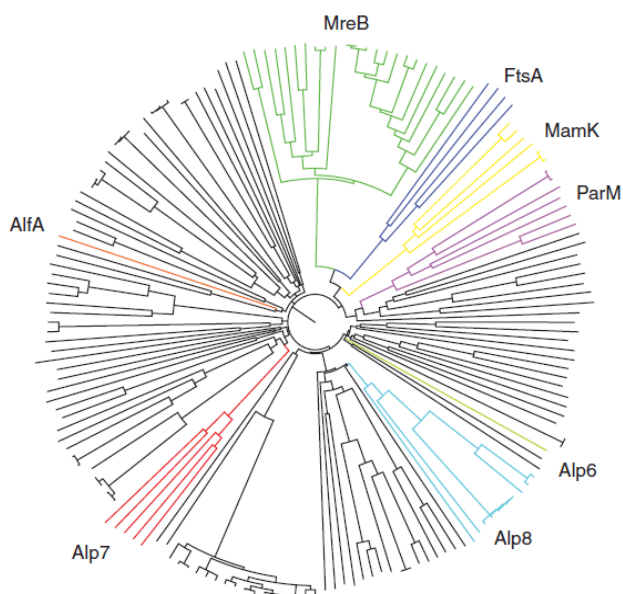
O monómero de 43 kDa da actina globular (ou G-actina) agrega-se espontaneamente *in vitro* para formar uma longa estrutura linear ou ramificada (actina filamentosa ou F-actina) por adição de sal ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{KCl}$ ), desde que o ATP esteja presente<sup>3</sup>. Os filamentos polimerizam de modo não covalente a partir de ambas as extremidades, com afinidades diferentes para a adição de monómeros a cada extremidade. Isso resulta numa polaridade intrínseca no filamento, sob a forma de uma extremidade de crescimento lento (extremidade menos) e uma extremidade de crescimento rápido (extremidade mais). No estado estacionário, a perda de subunidades na extremidade menor e o ganho equivalente na extremidade maior dão origem a um efeito conhecido como *treadmilling*<sup>1,2,4,5</sup>. Os microfilamentos de actina são finos (3 a 6 nm de diâmetro) e flexíveis, e raramente ocorrem de forma isolada dentro da célula, mas sim em agregados com ligação cruzada e feixes. *In vivo*, podem formar tanto estruturas estáveis como instáveis. A polimerização da actina é um processo altamente regulado, controlado tanto pela ligação e hidrólise de nucleótidos como pela ação de uma série de proteínas de ligação à actina que podem cruzar, nuclear, clivar, empacotar, estabilizar ou desestabilizar os filamentos<sup>3,6,7</sup>.

O citoesqueleto de actina é altamente dinâmico na maioria das células e as populações de F-actina agregam-se e desagregam-se continuamente, com semividas na ordem de alguns minutos. Este *turnover* é uma consequência da atividade ATPásica da actina. A hidrólise irreversível do nucleótido ligado ocorre quando o monómero está totalmente incorporado no filamento<sup>3</sup>, e assim, não é necessário para formar os filamentos de actina. Em vez disso, desestabiliza o polímero e promove a despolimerização das suas extremidades, uma vez que os monómeros de ATP preferem associar-se ao filamento e os monómeros de ADP preferem dissociar-se<sup>8</sup>.

As sequências em resíduos de aminoácidos da actina são extremamente conservadas entre eucariotas (por exemplo, existe 100% de identidade entre a actina de músculo esquelético humano e a de galinha e 88% de identidade para a actina da levedura *Saccharomyces cerevisiae*). Os principais critérios funcionais inicialmente usados para identificar actinas incluíram a capacidade desta polimerizar espontaneamente em filamentos

finos capazes de estimular a atividade ATPásica da miosina. No entanto, existe uma subfamília da actina altamente divergente, que ainda partilha uma similaridade de sequência significativa, mas que tem homologia funcional e especificidade de ligação ao ligando limitadas.

Estudos filogenéticos identificaram mais de 35 famílias altamente divergentes de proteínas homólogas bacterianas da actina<sup>9</sup> (Figura I.1.). Muitas das actinas bacterianas são codificadas por plasmídeos extracromossômicos, mas a maioria das espécies bacterianas com morfologias não esféricas também codifica homólogas cromossômicas da actina<sup>10</sup>.



**Figura I.1.** Árvore filogenética da superfamília das proteínas homólogas bacterianas da actina. As subfamílias de actinas bacterianas têm sido identificadas com base na homologia da sequência. As subfamílias cuja polimerização foi demonstrada experimentalmente estão coloridas e identificadas. Adaptado de <sup>11</sup>.

Além disso, numa publicação de referência, Bork *et al.* (1992) descreveram, através de análises bioinformáticas, um grande grupo de proteínas funcionalmente muito diferentes que partilham uma identidade/similaridade de sequência de resíduos de aminoácidos muito limitada, como, por exemplo, as proteínas de choque térmico, as cinases, e a proteína determinante da forma da célula procariótica, a MreB<sup>12</sup>. De facto, existe apenas  $\approx 15\%$  de identidade entre a MreB e a actina, o que é inferior aos 20% de identidade que geralmente são usados como base para estabelecer homólogos. No entanto, este grupo de proteínas contém cinco motivos de sequência conservados que foram previstos para determinar um *fold* tridimensional semelhante ao da actina.

### **I.1.2. Enquadramento histórico**

As proteínas bacterianas Mre (do inglês, *murein region* e, sendo a mureína, ou peptidoglicano, o principal componente da parede celular) são conhecidas há mais de um quarto de século como sendo determinantes da forma da célula<sup>13</sup>.

A MreB foi identificada pela primeira vez como uma proteína envolvida na regulação da forma da célula em *Escherichia (E.) coli*, em 1988, por Doi *et al.* Porém, como a MreB não pareceu estar significativamente mais relacionada com a actina do que as outras proteínas identificadas e apresenta pouca identidade na sequência com a actina, foi ignorada durante praticamente uma década<sup>13,14</sup>. No entanto, isto mudou em 2001, quando dois estudos mostraram que a MreB de *Bacillus (B.) subtilis* (BsMreB) forma filamentos do citoesqueleto *in vivo*<sup>15</sup> e que a MreB de *Thermotoga (T.) maritima* (TmMreB) forma filamentos do citoesqueleto *in vitro*<sup>16</sup>.

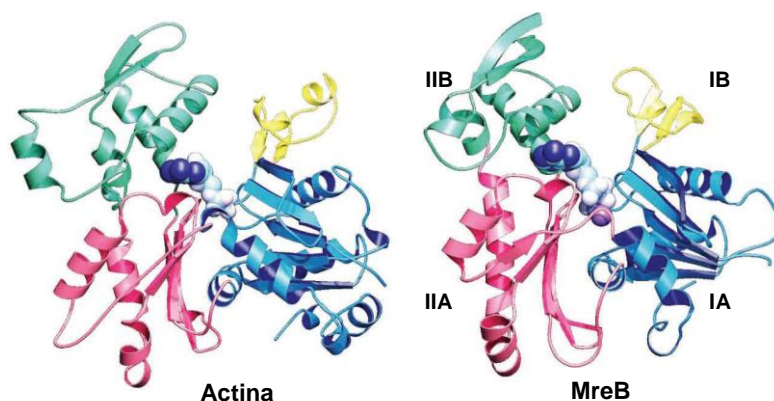
### **I.1.3. Caracterização**

A MreB é comum em bactérias com formas complexas (não esféricas), mas está ausente na maioria das bactérias que apresentam morfologias cocóides (esféricas)<sup>15</sup>. Encontra-se presente tanto em bactérias Gram-positivas como Gram-negativas. No entanto, em organismos Gram-positivos (*T. maritima* e *B. subtilis*) estão muitas vezes presentes várias cópias do gene *mreB*, enquanto em espécies Gram-negativas (*E. coli* e *Caulobacter crescentus*) geralmente está presente apenas uma cópia do gene *mreB*. O organismo em forma de bastonete *B. subtilis*, por exemplo, possui três genes semelhantes ao gene *mreB*, denominados por *mreB*, *mbl* (*mreB-like*, semelhante ao gene *mreB*) e *mreBH* (*mreB Homolog*, homólogo do gene *mreB*), que são 56, 51 e 51% idênticos à TmMreB1, respetivamente<sup>17</sup>. Contudo, também está presente em bactérias sem parede celular, como a *Chlamydomophila pneumoniae*, onde pode desempenhar um papel na divisão celular através da biossíntese de lípidos organizados espacialmente<sup>18</sup>.

Embora a abundância celular da MreB de *T. maritima* não seja conhecida, o estudo bioquímico e estrutural realizado por Nurse & Mariani (2013) demonstrou que a TmMreB pode ser obtida em quantidades muito mais elevadas do que a MreB de *E. coli* ( $\approx 40\,000$  moléculas por célula<sup>19</sup>) ou do que a BsMreB (8 000 moléculas por célula<sup>15</sup>), que correspondem a concentrações intracelulares *in vivo* de 0,2 mg/mL<sup>20</sup> (aproximadamente 5,6  $\mu$ M, dependendo da massa molecular da proteína).

O monómero da MreB, de, aproximadamente, 37 kDa, consiste em dois domínios alfa/beta (subdomínios IA, IB, IIA e IIB, que correspondem aos subdomínios 1, 2, 3 e 4, respetivamente, na actina) enrolados em torno do núcleo central da estrutura, a bolsa de ligação dos nucleotídeos (ver Figura I.2.)<sup>21,22</sup>. Os subdomínios maiores (IA e IIA) têm um *fold* comum conservado que compreende cinco folhas beta ( $\beta$ ) rodeadas por 3 hélices alfa ( $\alpha$ ),

enquanto os subdomínios menores (IB e IIB) são mais distintos dentro da superfamília da actina, provavelmente por estarem envolvidos em funções específicas, nomeadamente, divisão celular<sup>14,23–25</sup>, segregação cromossómica<sup>19,26,27</sup>, entre outras funções<sup>28</sup>. O ATP e o  $Mg^{2+}$  ligam-se numa região articulada que liga os domínios I e II, permitindo os movimentos interdomínios associados a diferentes estados funcionais da proteína<sup>4,5</sup>.



**Figura I.2.** Comparação das estruturas cristalinas da actina eucariótica e da proteína bacteriana MreB. Os quatro subdomínios da actina são mostrados em diferentes cores e as mesmas cores são usadas para os domínios equivalentes da proteína bacteriana. Os rótulos de subdomínios convencionais da actina estão representados na estrutura da MreB. Adaptado de <sup>29</sup>.

#### **I.1.4. A polimerização da MreB: semelhanças com a actina e variabilidade inter-espécies**

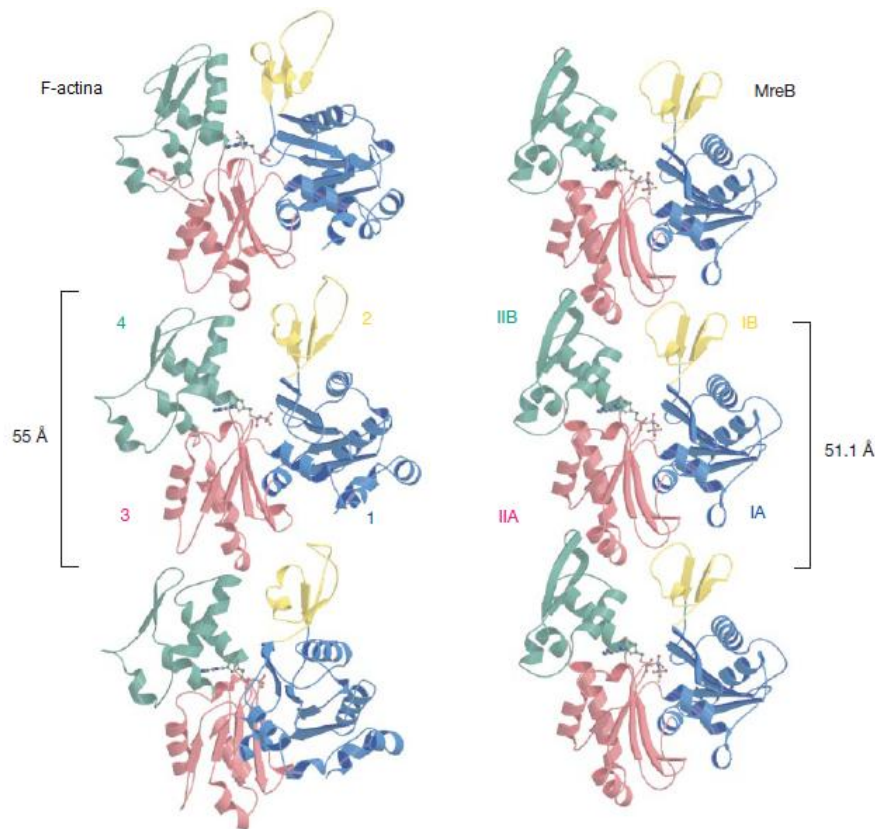
A proteína MreB tem a capacidade de formar filamentos, sendo que as propriedades de polimerização da MreB monomérica, em solução, revelaram algum paralelismo com a actina. De facto, esta última necessita de ATP e  $Mg^{2+}$  como cofatores, como mencionado anteriormente. A presença destes cofatores favorece cineticamente a formação de uma molécula iniciadora da nucleação para que as subunidades adicionais possam agregar-se para formar um filamento. A formação desta molécula iniciadora é favorecida acima de um certo nível de monómeros de actina, denominada concentração crítica<sup>5</sup>. A MreB também polimeriza na presença de ATP e  $Mg^{2+}$ , e com concentrações críticas que são similares às da actina<sup>17,30–32</sup>.

Pela sequência em resíduos de aminoácidos, a MreB é a proteína que está mais intimamente relacionada com a actina de todas as proteínas da superfamília da actina, embora existam pequenas diferenças entre ambas, tanto no local de ligação dos nucleótidos como nos resíduos que formam a interface monómero-monómero dentro de um protofilamento. As diferenças na interface monómero-monómero são interessantes porque é provável que tenham evoluído concomitantemente para manter a polimerização<sup>11</sup>.

A semelhança entre a actina e a MreB é, de igual modo, refletida nas estruturas do filamento, sendo que os espaçamentos entre os monómeros, na direção longitudinal, são muito



semelhantes em ambas: 55 e 51 Å, respetivamente (Figura I.3.)<sup>16</sup>. De referir, ainda, a existência de um elevado número de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na interface monómero-monómero, produzindo uma forte interação entre ambos<sup>11</sup>. As interações longitudinais monómero-monómero no protofilamento ocorrem entre os subdomínios IB e IIB numa subunidade e entre os subdomínios IA e IIA noutra subunidade<sup>33</sup>.



**Figura I.3.** Comparação das estruturas tridimensionais da F-actina de *Saccharomyces cerevisiae* (código PDB: 1YAG) e da MreB de *T. maritima* (código PDB: 1JCE). As estruturas cristalinas da MreB contêm protofilamentos que são semelhantes a uma cadeia (protofilamento) da F-actina modelada. Adaptado de <sup>16</sup>.

No entanto, os mecanismos bioquímicos da polimerização da MreB e a sua dinâmica intracelular continuam a ser uma área de pesquisa ativa. Consensualmente, encontra-se descrito que a MreB polimeriza em protofilamentos duplos na presença de ATP ou GTP e estes podem, ainda, agregar-se lateralmente em folhas<sup>16,31,32</sup>. Embora a arquitetura de um único protofilamento seja surpreendentemente conservada dentro da família da actina<sup>16,26,34–37</sup>, a polimerização dos protofilamentos em estruturas altamente ordenadas difere muito entre ambas<sup>33</sup>.

Contudo, e devido à existência de estudos contraditórios entre si, o que pode ser explicado pela utilização de diferentes proteínas recombinantes, não existe, até à data, uma visão consensual acerca da cinética de polimerização da MreB *in vitro*. De facto, Esue *et al.* (2005) publicaram os primeiros ensaios sobre a cinética de polimerização da MreB, utilizando a

MreB1 da *T. maritima* com cauda de His, chegando à conclusão que a polimerização é fortemente dependente da temperatura e das concentrações de diferentes iões em solução ( $K^+$  e  $Mg^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$ ). Estes autores determinaram uma concentração crítica de 3 nM, duas ordens de grandeza menor do que a obtida experimentalmente para a actina. Por seu turno, no trabalho de Bean & Amann (2008) foi purificada a forma nativa da MreB1 da *T. maritima* (*TmMreB1*) sem a presença da cauda de His, tendo sido descrita a existência de duas fases de polimerização, uma que utiliza catiões divalentes e uma que não o faz. Estas fases têm sido propostas como correspondentes às fases de nucleação e alongamento do polímero. A proteína purificada sem a presença da cauda de His foi, também, menos sensível à temperatura. Para além disso, Mayer & Amann (2009) purificaram e polimerizaram com sucesso a *BsMreB*. Esta proteína é 56% idêntica e 76% semelhante à *TmMreB1*. O comportamento cinético da polimerização de *BsMreB* foi muito diferente da *TmMreB1*. A polimerização da *BsMreB* necessitou de concentrações de catiões divalentes na gama do milimolar, foi favorecida por pH baixo e inibida por sais monovalentes e baixas temperaturas. Os autores descreveram que a *BsMreB* liga e hidrolisa ATP e GTP mas, surpreendentemente, não necessita de nucleótidos para polimerizar. De facto, a concentração crítica para a polimerização foi de  $\approx 900$  nM, independentemente da presença ou ausência de nucleótidos<sup>17,20,30</sup>.

Além disso, estudos realizados com a mesma proteína originaram conclusões diferentes. Por exemplo, as primeiras sugestões de que o  $Mg^{2+}$  não era estritamente necessário para a polimerização da *TmMreB*<sup>16</sup> ou que era até inibitório<sup>20</sup> foram contrastadas por um estudo que mostrou que o  $Mg^{2+}$  foi necessário para a rápida e extensiva polimerização da *TmMreB*<sup>30</sup>.

Além do papel não resolvido do  $Mg^{2+}$  no processo de polimerização da MreB, também a função do ATP tem sido questionada: a *BsMreB* parece formar filamentos na presença de ATP e ADP, ou até mesmo na ausência total de qualquer nucleótido<sup>17</sup>. Outras experiências mostraram que a *TmMreB* pode usar ATP ou GTP como substratos, ao contrário de outras proteínas, tais como a actina<sup>38</sup>. A razão para esta discrepância entre a *TmMreB* e a *BsMreB* não é clara. Um aspeto interessante a considerar é que diferentes proteínas MreB têm adaptações e propriedades específicas da espécie. A *TmMreB* e a *BsMreB*, por exemplo, têm aproximadamente 60% de identidade e 75% de similaridade de sequência, mas são nativas de bactérias com fisiologias diferentes: a *T. maritima* é uma bactéria aquática hipertermofílica, enquanto a *B. subtilis* é uma bactéria de solo e cresce a temperaturas moderadas.

Ao contrário dos vários requisitos para  $Mg^{2+}$  e ATP, o efeito de  $K^+$  na polimerização da MreB é mais coerente entre as proteínas de diferentes espécies. Na maior parte das bactérias, o  $K^+$  é o principal catião e desempenha papéis importantes, tais como a manutenção da pressão de turgescência celular e homeostase do pH<sup>39,40</sup>. Curiosamente, a polimerização da MreB é modulada negativamente ou inibida por concentrações fisiológicas de  $K^+$ <sup>17,30,31</sup>, o que pode ser explicado pelo facto das diferentes MreB se adaptarem de tal modo que o  $K^+$  no citoplasma evita a polimerização excessiva, uma vez que a “sobrepolimerização” poderia

alterar o equilíbrio com os seus parceiros de interação ou interferir com outros processos celulares.

### **I.1.5. Funções e dinâmica intracelular dos filamentos de MreB**

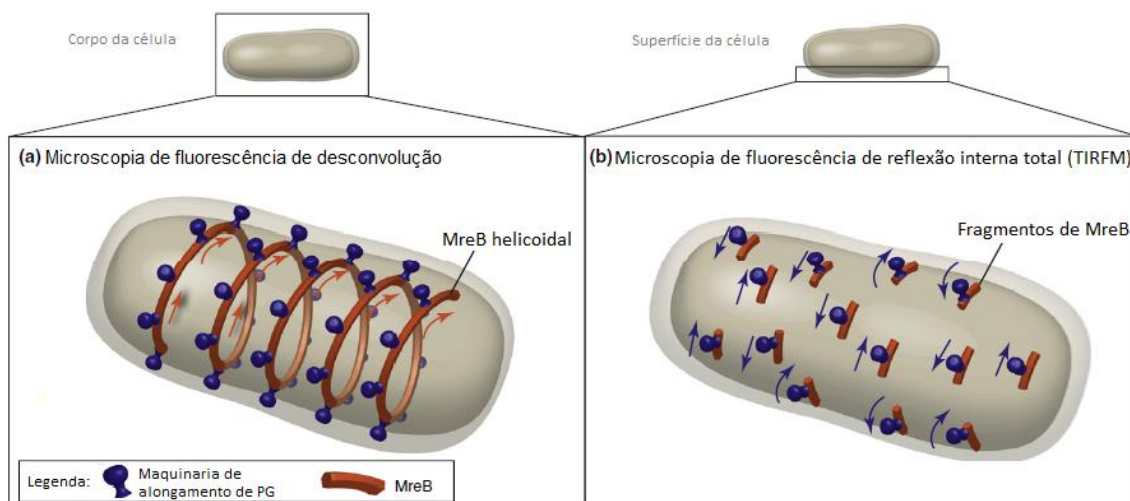
De facto, a MreB, uma das primeiras actinas bacterianas caracterizada, está totalmente integrada na fisiologia celular e desempenha vários papéis essenciais, tendo um grande impacto na síntese da parede celular, que é um fator determinante da forma da célula e da integridade da bactéria. Devido ao seu papel central na coordenação da maquinaria de síntese da parede celular<sup>10,12,15,41,42</sup>, a ausência da MreB por inativação genética ou tratamentos com drogas específicas (por exemplo, A22, S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea<sup>43-47</sup>), resulta em grandes defeitos morfológicos celulares na maioria das bactérias em forma de bastonete onde é encontrada, originando células deformadas e, eventualmente, a lise celular sob as condições habituais de crescimento<sup>13,48-50</sup>. No entanto, a MreB também participa na localização de uma série de outras proteínas e a sua localização incorreta afeta de modo negativo o direccionamento polar dos complexos proteicos e, em alguns organismos, a segregação cromossómica<sup>19,51-55</sup>.

A MreB interage direta ou indiretamente com várias proteínas incluindo os seus parceiros do operão, MreC e MreD, a proteína determinante da forma da célula RodZ, componentes da síntese da parede celular (proteínas de ligação ao peptidoglicano) e ainda a ARN polimerase<sup>54,56-60</sup>.

Imagens subcelulares da MreB indicam originalmente que esta forma uma estrutura helicoidal contínua que se move ao longo do comprimento da bactéria. Estas estruturas foram localizadas logo abaixo da membrana citoplasmática e estão correlacionadas com a organização e/ou localização de várias enzimas envolvidas na síntese da parede celular. Estas observações levaram a um modelo amplamente aceite em que a MreB forma uma estrutura helicoidal que suporta a síntese da parede celular. No entanto, este modelo da MreB helicoidal tem sido contestado nos últimos anos<sup>61-64</sup>. Imagens de alta-resolução avançadas por criotomografia eletrónica (ECT, do inglês *Electron CryoTomography*) de células *wild type* falharam na deteção de estruturas helicoidais contínuas perto ou ao longo da superfície da membrana interna<sup>63</sup>. Uma série de descobertas recentes sugerem que a MreB existe como “manchas” discretas que se movem perpendicularmente ao eixo da célula<sup>61,62,65</sup>. Esta discrepância pode ser racionalmente explicada. Os primeiros estudos de visualização da MreB dependeram amplamente de fusões da proteína fluorescente tanto no seu N- como no seu C-terminal. No entanto, a fusão perturba a função da MreB porque esses derivados não complementam a deleção do gene *mreB* das estirpes<sup>15,66</sup>. Além disso, esta modificação da proteína também pode levar a artefactos de localização grosseiros. Imagens de ECT mostram que a MreB forma estruturas helicoidais em *E. coli* quando se funde com a proteína amarela fluorescente<sup>67</sup>.

Quando a MreB é visualizada por microscopia de imunofluorescência ou quando é fundida com proteínas fluorescentes, adapta um padrão semelhante a uma espiral ou em fragmentos ao longo do comprimento da célula<sup>15,28,41,51,68</sup> (Figura I.4. (a) e (b), respectivamente).

A existência de feixes helicoidais da MreB que se movimentam, originalmente observados ao longo do comprimento das células em forma de bastonete<sup>15,41,51,68-71</sup>, tem sido questionada por estudos recentes de microscopia de fluorescência de reflexão interna total (TIRFM) que sugerem que a MreB forma fibras descontínuas debaixo da membrana celular que são conduzidas pela maquinaria de alongamento de peptidoglicano (Figura I.4. (b)).

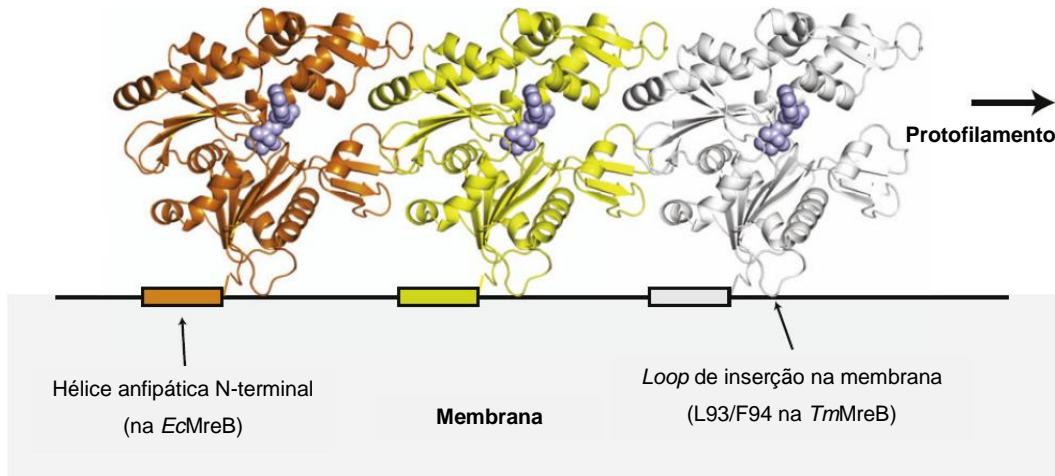


**Figura I.4.** Representação esquemática da comparação simplificada de duas técnicas microscópicas usadas para visualizar a ultraestrutura e o movimento da MreB. A MreB (a castanho) é observada em ambos os casos, (a) e (b), acoplada à maquinaria de alongamento de peptidoglicano (PG) (a azul), que coletivamente representa as enzimas de síntese da parede celular e as proteínas que determinam a forma da célula. (a) representa o que se observa através de microscopia de fluorescência de desconvolução, onde as imagens obtidas através do corpo da célula descrevem uma MreB estruturada helicoidalmente. (b) através de TIRFM, uma técnica de alta resolução capaz de captar a superfície de um lado de uma bactéria e útil para a visualização de atividades na membrana, verificou-se que tanto a MreB como uma seleção de várias proteínas de alongamento de PG se movem em pequenos fragmentos, em oposição aos longos filamentos helicoidais com mobilidade bidirecional. As representações esquemáticas não se encontram à escala. Adaptado de<sup>72</sup>.

Como mencionado anteriormente, nas células os filamentos de MreB (ou fragmentos de filamentos) estão localizados perto da membrana interna. Acredita-se que esta localização foi mediada por interações da MreB com proteínas ligadas à membrana e com a maquinaria de síntese da parede celular.

No entanto, Salje *et al.* (2011) demonstraram que a MreB pode interagir diretamente com as membranas fosfolipídicas. No caso da *TmMreB*, tal é mediado por um pequeno *loop* de inserção na membrana, que consiste em dois resíduos hidrofóbicos, perto do N-terminal. Para a *EcMreB*, no entanto, a associação direta na membrana envolve uma hélice anfipática na região N-terminal<sup>73,74</sup> (Figura I.5.). A tendência da MreB purificada a partir de bactérias Gram-negativas para agregar pode ser atribuída à presença destas sequências hidrofóbicas. A

razão para os diferentes mecanismos de ligação à membrana é desconhecida, mas esta descoberta ilustra a existência de características específicas de espécies dentro da família de proteínas MreB.



**Figura I.5.** Modelo para a interação de um filamento de MreB com a membrana. Na imagem é mostrado o *loop* de inserção na membrana necessário para a *TmMreB* (à direita) bem como a hélice anfipática N-terminal da *EcMreB* (à esquerda). Adaptado de <sup>73</sup>.

Além disso, como já foi referido anteriormente, a fusão da proteína fluorescente ao N- ou C-terminal da MreB não são funcionais nas células. No monómero da MreB, ambos os terminais estão localizados perto um do outro, pelo que as fusões a ambas as extremidades interferem com a ligação à membrana. Nas fusões em “sanduíche” a proteína verde fluorescente é inserida entre as hélices 6 e 7 da MreB, ou seja, longe do local de interação com a membrana<sup>66</sup>.

Concluindo, todas as actinas bacterianas que têm sido estudadas formam filamentos dependentes do ATP *in vitro*<sup>32,33,36,37,73,75,76</sup> e têm padrões de localização filamentosos *in vivo*<sup>9,27,77,78</sup>, o que sugere a conservação das funções nucleares do citoesqueleto semelhantes às da actina.

## I.2. A bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

A bactéria *Marinobacter (M.) hydrocarbonoclasticus* estirpe SP17 (ATCC 49840) foi isolada a partir da água do mar da costa mediterrânica francesa, perto de uma refinaria de petróleo<sup>79,80</sup>. É uma bactéria Gram-negativa, aeróbica, extremamente halotolerante e moderadamente halofílica<sup>79,81–83</sup>, em forma de bastonete (0,3 – 0,6 µm de diâmetro e 2 – 3 µm de comprimento na fase exponencial de crescimento) (Figura I.6.), não forma esporos e move-se por meio de um flagelo polar [em meios com baixa ( $\leq 0,2$  M) ou elevada concentração de NaCl ( $\geq 1,5$  M) este flagelo é inexistente].



Figura I.6. Imagem de microscopia eletrônica da *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*<sup>84</sup>.

A bactéria *M. hydrocarbonoclasticus* cresce em meios de cultura com uma concentração de NaCl compreendida entre 0,08 e 3,5 M (sendo que a concentração ótima é de 0,6 M), numa gama de temperatura entre 10 °C e 45 °C, com temperatura ótima de crescimento a 32 °C, e num intervalo de pH 6 a 9,5 (sendo o pH ótimo 7 a 7,5). O teor de NaCl é importante para a *M. hydrocarbonoclasticus*, pois a concentração de NaCl afeta a forma e a flagelação destas células<sup>79</sup>.

O crescimento anaeróbio ocorre na presença de nitrato, succinato, citrato ou acetato, mas não na presença de glucose. Para além disso, é ainda capaz de degradar diversos hidrocarbonetos e utilizá-los como fontes de carbono e energia<sup>79</sup>. No geral, a *M. hydrocarbonoclasticus* tem a capacidade de habitar e crescer numa grande variedade de ambientes do ecossistema marinho. Esta bactéria forma colónias de cor branca em meio sólido, que se tornam bege rosado após 48 h de incubação<sup>79</sup>.

A análise da sequência do ARNr 16S de *M. hydrocarbonoclasticus* mostrou que esta bactéria pertence à subclasse  $\gamma$  (gama) do grupo das *Proteobactérias* e é distinta de bactérias com propriedades morfológicas e bioquímicas similares<sup>79,83</sup>. Este estudo evidenciou, também, a sua proximidade filogenética com outras espécies, tais como *Marinomonas vaga*, *Oceanospirillum linum*, *Halomonas elongata* e *Pseudomonas aeruginosa*. Devido à dificuldade em encontrar-se uma única espécie significativamente mais próxima do que as enumeradas anteriormente, a bactéria *M. hydrocarbonoclasticus* foi classificada como um novo género e a

estirpe-tipo foi depositada na *American Type Culture Collection* como ATCC 49840<sup>79</sup>. No entanto, esta bactéria foi, inicialmente, classificada por Baumann *et al.* (1972) como *Pseudomonas (Ps.) nautica* através de um estudo de caracterização taxonómica polifásica de bactérias Gram-negativas, flageladas, não fermentativas e de origem marinha, obtidas da costa de Oahu, Hawaii. Com base na caracterização fisiológica e nutricional, as estirpes foram associadas a diferentes grupos estabelecidos em semelhanças fenotípicas (substratos orgânicos usados como fontes de carbono e energia, o conteúdo G+C do DNA e a capacidade de degradar hidrocarbonetos)<sup>85,86</sup>.

Segundo Baumann *et al.* (1972) seriam necessários mais estudos a fim de se obter as características adequadas que permitissem dividir este conjunto de organismos em géneros bem definidos. De facto, a reclassificação desta espécie foi realizada, mais tarde, por Spröer *et al.* (1998), através de um estudo comparativo entre as espécies *Ps. nautica* descrita por Baumann *et al.* (1972) e *M. hydrocarbonoclasticus* classificada por Gauthier *et al.* (1992). Esta nova análise baseou-se na comparação das sequências dos seus ARNr 16S, composição base do ADN genómico total e hibridação ADN-ADN destas duas bactérias, as quais evidenciaram uma elevada identidade de sequência (cerca de 99,5%). Esta comparação foi confirmada através das suas propriedades fenotípicas e, portanto, foi proposta a unificação das duas espécies<sup>87</sup>. Assim sendo, transferiu-se a espécie *Pseudomonas nautica* para *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (ATCC 49840<sup>T</sup>)<sup>82,87</sup>.

Mais tarde, as espécies *M. hydrocarbonoclasticus*<sup>79</sup> e *M. aquaeolei* (bactéria moderadamente halofílica isolada de uma plataforma petrolífera do Vietname do Sul), caracterizadas por Huu *et al.* (1999), foram, também, revistas por Márquez e Ventosa (2005), tendo sido, então, classificadas como sendo a mesma espécie<sup>80,83</sup>.

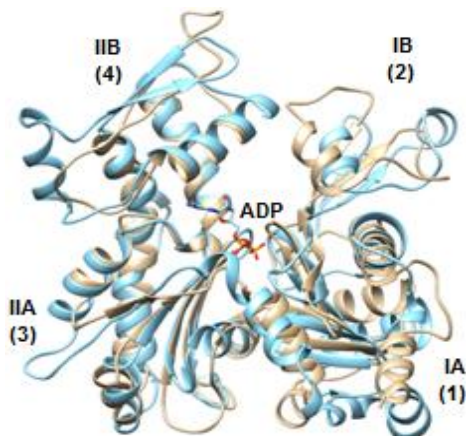
No presente trabalho utilizar-se-á a denominação de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (sinónimo heterotípico de *Ps. nautica* e *M. aquaeolei*), uma vez que foi a primeira espécie descrita. A estirpe utilizada neste trabalho foi a *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840, sendo que a análise genética é baseada no genoma que se encontra depositado na base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)<sup>88</sup>.

### I.3. A MreB de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

Uma vez que não existe, até ao momento, a estrutura da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*, criou-se um modelo por homologia através da plataforma *online I-Tasser*, tendo sido utilizada como *template* a estrutura da *TmMreB* (código PDB: 1JCF). O modelo foi criado a partir da sequência em resíduos de aminoácidos da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* depositada base de dados da *National Center for Biotechnology*



Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), tendo este sido comparado com a estrutura de  $\alpha$ -actina de coelho (*Oryctolagus cuniculus*; código PDB: 1J6Z) (Figura I.7.).



**Figura I.7.** Sobreposição estrutural da actina (código PDB: 1J6Z, a azul) e da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* (do modelo por homologia, a creme), com um RMSD de 1,22 Å. Ambas as proteínas partilham a mesma topologia, arquitetura de quatro domínios e a maior parte dos resíduos envolvidos na ligação ao ATP e magnésio. O modelo foi criado utilizando a plataforma *online I-Tasser* e a sobreposição das estruturas utilizando o programa *UCSF Chimera*.

De facto, e como se pode observar, a MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* partilha alguma homologia estrutural com a actina, a arquitetura dos quatro subdomínios e a maior parte dos resíduos envolvidos na ligação ao ATP e ao magnésio. No entanto, até à data, não se efetuou qualquer caracterização bioquímica ou estrutural desta proteína, encontrando-se por determinar se, à semelhança das MreB provenientes de outras espécies bacterianas, também esta partilha com a actina eucariota algumas das suas características fundamentais.

## I.4. Objetivo

Deste modo, na primeira parte deste trabalho pretende-se clonar o gene que codifica a proteína MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* no vetor de expressão pET-22b(+), procedendo-se, em seguida, à purificação da proteína MreB por centrifugações diferenciais e técnicas cromatográficas (Cromatografia de troca aniónica e filtração em gel).

A proteína pura será usada na caracterização bioquímica e estrutural da MreB, usando técnicas espectroscópicas, nomeadamente, espectroscopia de UV-Visível, dispersão de luz e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, com a finalidade de determinar se a MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* tem a mesma capacidade de polimerizar/despolimerizar que a sua homóloga eucariótica, e em que condições, e qual o modo de interacção dos nucleótidos com a proteína.



## Capítulo II Materiais e Métodos

### II.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados são de elevado grau de pureza (analítico). Apresentam-se os seus nomes, bem como as empresas que os comercializam e, quando necessário, entre parêntesis acrescenta-se a sua descrição ou a fórmula química.

Ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , *Riedel*), Ácido Clorídrico ( $\text{HCl}$ , *Panreac*), Acrilamida (*Merck*), Agar (*BD*), Agarose (*nzytech*), Ampicilina (*Sigma*), ATP (Adenosina-5'-Trifosfato,  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$ , *Sigma*), Azul de Bromofenol (*Merck*), Azul de Coomassie R-250 (*Sigma*), Bisacrilamida (*Sigma*),  $\beta$ -Mercaptoetanol (*Aldrich*), Cloreto de Cálcio ( $\text{CaCl}_2$ , *Merck*), Cloreto de Magnésio ( $\text{MgCl}_2$ , *Riedel*), Cloreto de Potássio ( $\text{KCl}$ , *Panreac*), Cloreto de Sódio ( $\text{NaCl}$ , *Panreac*), CTP (Citosina-5'-Trifosfato,  $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_{14}\text{P}_3$ , *Sigma*), EDTA 99% (ácido etilenodiaminotetracético,  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ , *Merck*), Etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , *Merck*), GTP (Guanosina-5'-Trifosfato,  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{14}\text{P}_3$ , *Sigma*), IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosídeo, *nzytech*), LB (do inglês, *Luria Broth*; 10 g/l Bactotripton, 5 g/l Extracto de levedura, 10 g/l  $\text{NaCl}$ , pH 7,0, *nzytech*), Glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ , *Sigma*), Hidróxido de Sódio ( $\text{NaOH}$ , *Riedel-de Haen*), Isopropanol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ , *Merk*), Marcador de massas moleculares (*Fermentas*), Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , *Sigma*), PSA (persulfato de amónia, *nzytech*), SDS (Dodecilo Sulfato de Sódio,  $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ , *Merck*), SOC (do inglês, **Super Optimal broth with Catabolite repression**, 20 g/l Bactotripton, 5 g/l extracto de levedura, 10 g/l  $\text{NaCl}$ , 0,19 g/l  $\text{KCl}$ , 2,0 g/l  $\text{MgCl}_2$  e 3,6 g/l Glucose), *SYBR Safe* (*Invitrogen*), TEMED (N,N,N',N',tetrametilenodiamina, *Fluka*), Tricina (*Sigma*), Tris (tris(hidroximetil)aminometano,  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , *Sigma*).

### II.2. Procedimento experimental

#### II.2.1. Clonagem da MreB de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

##### II.2.1.1. Alinhamento de sequências

O alinhamento de sequências permite analisar sequências primárias de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) ou proteínas, sendo possível identificar regiões similares que possam ser consequência de relações funcionais, estruturais ou evolucionárias<sup>89</sup>. Para se realizar o alinhamento de sequências, obtidas através da base de dados da *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizou-se o programa informático *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Esta ferramenta calcula a melhor

correspondência para as sequências selecionadas e alinha-as com base na semelhança entre bases azotadas ou resíduos de aminoácidos, caso se trate de ADN ou proteína, respetivamente. Deste modo, as identidades, semelhanças e diferenças entre as sequências em análise podem ser facilmente identificadas.

No presente trabalho, alinharam-se as sequências em resíduos de aminoácido da proteína MreB de várias bactérias (*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Escherichia coli*, *Caulobacter crescentus*, *Bacillus subtilis* e *Thermotoga maritima*), bem como as sequências em nucleótidos correspondentes às regiões codificantes do gene da MreB da bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* e da  $\alpha$ -actina de músculo-esquelético humano (*Homo sapiens*).

#### **II.2.1.2. Reação em Cadeia da Polimerase**

Uma vez que se sabia qual a sequência em nucleótidos da proteína de interesse (ver secção III.1.1. de Resultados e Discussão), foi possível a sua amplificação, recorrendo a uma reação de PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*; Reação em Cadeia da Polimerase). De facto, as reações de PCR têm como objetivo a amplificação, em poucas horas e *in vitro*, do fragmento de ADN de interesse, utilizando uma enzima que se liga a um determinado segmento (oligonucleótido iniciador; *primer*) de uma cadeia para construir a cadeia complementar<sup>90</sup>.

Para amplificar o gene que codifica a proteína MreB a partir do ADN genómico de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, construíram-se os oligonucleótidos iniciadores com as zonas de restrição para as enzimas *EcoRI* (MreB\_FWD) e *XhoI* (MreB\_RVS), assinaladas a vermelho, através do programa informático *OligoPerfect™ Designer* (<http://tools.lifetechnologies.com/content.cfm?pageid=9716>):

MreB\_FWD: 5' – CCG**GAATTC**AATGTTAATCAAAAGACTCCGAGG – 3' (*Sigma*);

MreB\_RVS: 5' – CCAG**CTCGAG**TCATTACCCCTCCTGGGAGAAC – 3' (*Sigma*),

com as características apresentadas na Tabela II.I. Nas Tabelas II.II. e II.III. encontram-se descritos a composição da reação de PCR e o programa de amplificação utilizado, respetivamente. Utilizaram-se duas polimerases diferentes, sendo que a *Taq DNA Polymerase* (Taq; 5 U/ $\mu$ L; *GE Healthcare*) foi utilizada nos testes em que se variou a concentração de  $MgCl_2$  e com o ADN genómico (uma colónia ou 1  $\mu$ L de uma solução preparada previamente com uma colónia fervida em 100  $\mu$ L de água durante 5 minutos) para um volume final de 25  $\mu$ L, enquanto a *High Fidelity Taq DNA Polymerase* (HF Taq; 5 U/ $\mu$ L; *Expand Long Range, dNTPack, Roche*) se usou apenas para um volume final de 50  $\mu$ L, após otimizadas as condições.

**Tabela II.I.** Características dos *primers* utilizados nas reações de PCR. MM – Massa Molecular, T<sub>m</sub> – Temperatura de *melting* (fusão), % GC e µg/100µM.

<i>Primer</i>	MM (Da)	T <sub>m</sub> (°C)	% GC	µg/100µM
<b>MreB_FWD</b>	10159	75,6	42,4	435
<b>MreB_RVS</b>	9734	79,5	59,3	381

**Tabela II.II.** Composição das reações de PCR utilizadas para amplificação do gene de MreB do genoma de *M. hydrocarbonoclasticus*. Solução Tampão com 15 mM MgCl<sub>2</sub> (10x conc.; *GE Healthcare*), usado para a enzima *Taq DNA Polymerase* ou Solução Tampão com 12,5 mM MgCl<sub>2</sub> (5x conc.; *Roche*), usada para a enzima *High Fidelity Taq DNA Polymerase*; dNTP's (onde N = C, T, G ou A; [dNTP's]<sub>stock</sub> = 2,5 mM); *primers* MreB\_FWD e MreB\_RVS ([*primers*]<sub>stock</sub> = 10 µM); MgCl<sub>2</sub> ([MgCl<sub>2</sub>]<sub>stock</sub> = 25 mM); e ADN polimerase (*Taq* ou *HF Taq*; 5 U/µL). O volume final para a reação com a *Taq* e respetivo tampão e para os testes com MgCl<sub>2</sub> e ADN genómico foi de 25 µL e para a reação com a *HF Taq* foi de 50 µL. O volume de dNTP's e de *primers* das reações com um volume final de 25 ou 50 µL, é apresentado à esquerda e à direita da barra, respetivamente.

Componentes	Reações (volumes em µL)
	#1
Solução Tampão (10x conc.)	2,5
ou Solução Tampão (5x conc.)	10
dNTP's (2,5 mM)	2 / 4
Oligonucleótido MreB_FWD (10 µM)	2,5 / 5
Oligonucleótido MreB_RVS (10 µM)	2,5 / 5
ADN genómico	colónia / 1
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5
<i>Taq DNA Polymerase</i> (5 U/µL) ou	0,2
<i>High Fidelity Taq DNA Polymerase</i> (5 U/µL)	0,3
H <sub>2</sub> O até perfazer 25 ou 50 µL	

**Tabela II.III.** Programa de amplificação utilizado em todas as reações de PCR descritas ao longo do presente trabalho. Passo 1 – Desnaturação inicial; 2 – Desnaturação; Passo 3 – Hibridação; Passos 4 – Extensão; 6 – Extensão final.

Passo	Temperatura (°C)	Tempo (min. seg)
1	95 °C	5. 0
2	95 °C	0. 45
3	55°C	0. 45
4	72 °C	2. 0
5	Repetição dos passos de 2 a 4 (35 vezes)	
6	72 °C	10. 0
7	4 °C	Pausa

### **II.2.1.3. Eletroforese em gel de agarose**

Para preparar o gel de agarose (*Nzytech*), esta foi dissolvida em tampão de eletroforese – TAE (Tris-Acetato-EDTA; 40 mM Tris-Acetato, 2 mM EDTA, pH 8,5). Segundo Sambrook & Russel (2001), para que os fragmentos de ADN entre 0,5 e 10 kb sejam eficientemente separados, a concentração de agarose indicada é de 1% (m/V), tendo sido esta a concentração utilizada.

Para dissolver a agarose, aqueceu-se a mistura até a solução ficar homogênea e transparente. Colocou-se o tabuleiro da tina de eletroforese no respetivo suporte de preparação do gel e verteu-se a agarose, ainda morna, no tabuleiro, até uma altura de aproximadamente 5 mm, tendo solidificado à temperatura ambiente.

Adicionou-se, num tubo de 1,5 mL, 5, 10 ou 12,5 µL de amostra ou 5 µL do marcador de massas moleculares (constituído por fragmentos de ADN com 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bp; *Fermentas*) e 5 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol, 2,5 mL de glicerol, 500 µL de SDS, 50 µL de 1 M Tris-HCl, pH 8,0;  $V_{\text{final}} = 5 \text{ mL}$ ). Aplicaram-se as amostras no gel e aplicou-se uma voltagem de 100 V durante, aproximadamente, 20 minutos.

O gel foi corado com um corante fluorescente, *SYBR® Safe* [1× conc. em solução tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH ~ 8,3)], durante aproximadamente 30 minutos, protegendo-se o gel da luz devido à fotossensibilidade do corante. O *SYBR® Safe* foi desenvolvido especificamente para reduzir a mutagenicidade, quando comparado com o brometo de etídio, comumente usado anteriormente; é um corante que se intercala entre as bases dos ácidos nucleicos, tem fluorescência de excitação máxima a 280 e 502 nm e uma emissão máxima de 530 nm<sup>91</sup>. Examinou-se o gel por exposição à luz ultravioleta e o registo foi efetuado por um transiluminador (*VWR, GenoSmart*) com sistema de documentação de gel.

### **II.2.1.4. Ligação entre o vetor pET-22b(+) e o fragmento de ADN de interesse**

Para clonar o gene da MreB num vetor de expressão (pET-22b(+)) para a posterior sobre-expressão da proteína, foi necessário, primeiramente, hidrolisá-lo com as enzimas de restrição de interesse (*EcoRI* e *XhoI*), purificar o vetor digerido e desfosforilar as extremidades, para evitar a auto-ligação. Além disso, também o fragmento de ADN de interesse foi hidrolisado usando as mesmas enzimas, tendo, de seguida, sido purificado, de acordo com o abaixo descrito.

II.2.1.4.1. Reação de hidrólise do vetor pET-22b(+) e do fragmento de ADN de interesse (gene de MreB) com enzimas de restrição

A reação de hidrólise do vetor pET-22b(+) e do fragmento de ADN que codifica para a proteína MreB com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* teve como objetivos a linearização do vetor e a formação de extremidades coesivas que, por complementaridade, permitiriam a posterior ligação do fragmento de interesse ao vetor de expressão pET-22b(+).

Assim, após a obtenção do ADN plasmídico do vetor pET-22b(+) e do fragmento de ADN de interesse, realizou-se a digestão dos mesmos com as enzimas de restrição, adicionando-se num tubo de 1,5 mL os componentes descritos na Tabela II.IV.; estes foram incubados a 37 °C, durante 4 horas, e o resultado foi verificado por eletroforese em gel de agarose (1%).

**Tabela II.IV.** Reação de hidrólise do vetor pET-22b(+) e do fragmento de ADN de interesse com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* (10 U/μL; *Invitrogen*) em solução tampão *REact® 2* (10x conc.; *Invitrogen*).

Componentes	Volumes (μL)
Vetor pET-22b(+) / fragmento de ADN de interesse	20
<i>EcoRI</i> (10 U/μL)	1
<i>XhoI</i> (10 U/μL)	1
Solução tampão <i>REact® 2</i> (10x conc.)	5
H <sub>2</sub> O até 50 μL	

II.2.1.4.2. Purificação do vetor pET-22b(+) e do fragmento de ADN de interesse

O *kit* comercial de purificação *NZYGelpure* (*nzytech*) foi concebido para a purificação de ADN a partir de géis de agarose em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) ou Tris-Borato-EDTA (TBE) e para a purificação direta do produto das reações de PCR, podendo ser utilizado para purificar fragmentos de ADN de 100 bp a 10 kb.

Este *kit* de purificação utiliza uma membrana de sílica-gel que absorve seletivamente fragmentos de ADN até 10 μg na presença de soluções tampão de ligação especializadas. A agarose solúvel, os nucleótidos, os oligonucleótidos (< 30 nt), as enzimas, os óleos minerais e outras impurezas, não se ligam à membrana e são lavados. Os fragmentos de ADN são, em seguida, eluídos da coluna e podem ser utilizados para protocolos posteriores, sem processamento adicional<sup>92</sup>.

O tampão de ligação contém um indicador de pH, que permite a avaliação do pH ótimo para a ligação de ADN (pH ≤ 7,5), sem interferir com a própria ligação de ADN. A adsorção do ADN à membrana só é eficiente a um valor de pH ≤ 7,5 (mistura amarela). Se o valor de pH >

7,5 (mistura laranja ou violeta), deve adicionar-se 10 µL de 3 M acetato de sódio, pH 5,0, e misturar.

#### *II.2.1.4.2.1. Purificação do vetor pET-22b(+) e do produto da reação de PCR*

Para purificar tanto o vetor pET22b(+) como o produto resultante da reação de PCR, transferiu-se o volume da mistura da reação (20 µL de pET-22b(+)) e 45 µL do produto da reação de PCR) para um tubo de 1,5 mL e adicionou-se 5 volumes do Tampão de Ligação<sup>1</sup>; misturou-se, por inversão, e centrifugou-se brevemente para coletar a amostra.

De seguida, adicionou-se a mistura acima na coluna de centrifugação da *NZYTech* e deixou-se repousar durante 2 minutos (o volume máximo de reservatório da coluna é de 700 µL; para volumes de amostra superiores a 700 µL basta aplicar e centrifugar tantas vezes quantas as necessárias); centrifugou-se durante 1 minuto a 14 324 xg e descartou-se o fluxo atravessado pela coluna.

Para lavar a coluna, adicionou-se 600 µL do Tampão de Lavagem e deixou-se repousar na coluna durante 2 minutos; centrifugou-se durante 1 minuto a 14 324 xg e descartou-se o fluxo atravessado pela coluna. Para secar a membrana da coluna de centrifugação *NZYTech* do etanol residual, centrifugou-se, novamente, durante 1 minuto a 14 324 xg.

Por fim, para eluir o ADN, colocou-se a coluna de centrifugação *NZYTech* num novo tubo de 1,5 mL e adicionou-se 30 µL do Tampão de Eluição<sup>2</sup> no centro da coluna, a 55 °C, para aumentar a eficácia da eluição e obter uma maior concentração de ADN (é essencial que o Tampão de Eluição seja aplicado diretamente no centro da coluna), incubou-se durante 2 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se a 11 000 xg. Para recuperar a máxima quantidade de ADN repetiu-se o passo de eluição.

#### *II.2.1.4.2.2. Purificação do ADN a partir do gel de agarose*

A digestão do produto de PCR correspondente à amplificação do gene da MreB com a enzima *EcoRI* resultou, após visualização em gel de agarose, em mais do que um fragmento, o que pode ser explicado pelo facto desta enzima possuir atividade “estrela” (*star activity*). Esta atividade “estrela” ocorre quando as enzimas de restrição hidrolisam sequências de reconhecimento que são semelhantes – mas não idênticas – à sua sequência de reconhecimento. Deste modo, para purificar o fragmento de ADN de interesse a partir do gel de agarose, este foi excisado a partir do gel com um bisturi afiado e limpo e pesou-se, tendo-se utilizado, de igual modo, o *kit* da *nzytech* acima mencionado, alterando-se apenas o protocolo de purificação<sup>93</sup>.

---

<sup>1</sup> Tampão de Ligação – contém Tiocianato de guanidina. Deve-se usar luvas quando se utiliza este *kit*.

<sup>2</sup> Tampão de Eluição – solução de 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.

Assim, adicionou-se 300 µL do Tampão de Ligação por cada 100 mg de gel, incubou-se a 50 °C durante 10 minutos, agitou-se ocasionalmente até a agarose estar completamente dissolvida, e verificou-se que a mistura apresentava uma tonalidade amarela (semelhante à cor do Tampão de Ligação), não sendo, por isso, necessário acertar o valor do pH.

Para finalizar esta etapa, antes de se colocar a coluna de centrifugação *NZYTech* num tubo de recolha de 2 mL, adicionou-se um volume de isopropanol à amostra (por exemplo: para uma porção de gel que pese 125 mg são necessários 125 µL de isopropanol) e homogeneizou-se.

Aplicou-se a mistura acima na coluna de centrifugação *NZYTech* e deixou-se repousar durante 1 minuto; centrifugou-se durante 1 minuto a 14 324 xg e descartou-se o fluxo atravessado pela coluna.

Para lavar a coluna e para eluir o ADN, o procedimento efetuado é idêntico ao da purificação do vetor (digerido e não digerido) e do produto da reação de PCR.

#### II.2.1.4.3. Desfosforilação do vetor pET-22b(+)

Para evitar a auto-ligação do vetor pET-22b(+) digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* e purificado de acordo com o acima descrito, é necessário desfosforilar as extremidades 5' – fosfato (5' – P), utilizando a enzima fosfatase alcalina que remove os grupos fosfato da extremidades 5' das moléculas de ADN, substituindo-os por grupos hidroxilo (5' – OH). A desfosforilação do vetor pET-22b(+) foi realizada utilizando as condições descritas na Tabela II.V. A reação de desfosforilação foi incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos e, posteriormente, a 65 °C durante 15 minutos, para inativar a enzima fosfatase alcalina.

**Tabela II.V.** Reação de desfosforilação do vetor pET-22b(+) digerido e purificado, utilizando a enzima fosfatase alcalina (1 U/µL; *Promega*) e a solução tampão de desfosforilação (10x conc.; *Promega*).

Componentes	Volumes (µL)
pET-22b(+) digerido com <i>EcoRI</i> e <i>XhoI</i> e purificado	5
Fosfatase alcalina (1 U/µL)	1
Solução tampão de desfosforilação (10x conc.)	1
H <sub>2</sub> O até 10 µL	

### II.2.1.5. Reação de ligação do fragmento de interesse digerido e purificado ao vetor pET-22b(+) digerido, purificado e desfosforilado

A reação de ligação do fragmento de interesse ao vetor de expressão linearizado envolve a formação de ligações fosfodiéster entre os resíduos 5' – P e 3' – OH, que podem ser catalisadas por duas ligases diferentes: *E. coli* ADN ligase e ADN ligase isolada do bacteriófago T4<sup>94</sup>.

O kit comercial utilizado (*Rapid DNA Ligation; Roche*) permite ligar rapidamente ADN com extremidades cegas ou extremidades coesivas. Dependendo da concentração de ADN na reação, os produtos de ligação podem ser circulares (se a concentração de ADN for baixa) ou concateméricos, ou seja, longas moléculas contínuas que contêm múltiplas cópias da mesma sequência de ADN ligadas em série (se a concentração de ADN for elevada)<sup>95</sup>.

A reação de ligação ao vetor de expressão pET-22b(+) foi realizada utilizando as condições descritas na Tabela II.VI. A reação de ligação foi incubada à temperatura ambiente durante 15 minutos.

**Tabela II.VI.** Reação de ligação do fragmento de ADN de MreB digerido e purificado ao vetor pET-22b(+) digerido, purificado e desfosforilado em solução tampão de diluição de ADN (5x conc.; *Roche*), à qual foi, posteriormente, adicionada a enzima *T4 DNA Ligase* (5 U/μL; *Roche*) e a respetiva solução tampão de ligação (2x conc.; *Roche*).

Componentes	Volumes (μL)
<b>Vetor pET-22b(+) digerido, purificado e desfosforilado</b>	1
<b>Fragmento de ADN de MreB digerido e purificado</b>	6
<b>Solução Tampão de Diluição de ADN (5x conc.)</b>	2
<b>H<sub>2</sub>O até 10 μL</b>	
<b>Solução Tampão de Ligação da <i>T4 DNA Ligase</i> (2x conc.)</b>	10
<b><i>T4 DNA Ligase</i> (5 U/μL)</b>	1

A correta ligação foi analisada através de um gel de agarose, sabendo que o produto resultante teria que possuir uma massa molecular correspondente à soma das massas do vetor e do fragmento de interesse (6600 bp). Além disso, a digestão do produto da reação de ligação com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* teria que resultar na visualização, em gel de agarose, de duas bandas, correspondentes às massas moleculares do vetor pET-22b(+) linearizado e do gene da MreB (aproximadamente 5500 bp e 1100 bp, respetivamente). Esta digestão de confirmação foi realizada de forma semelhante ao descrito na secção II.2.1.4.1. do presente capítulo, adicionando-se num tubo de 1,5 mL os componentes descritos na Tabela II.VII.; estes foram incubados a 37 °C, durante 1 hora, e o resultado foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1% (ver secção II.2.1.3. dos Materiais e Métodos).



**Tabela II.VII.** Reação de hidrólise do ADN plasmídico do fragmento de interesse inserido no vetor pET-22b(+) com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* (10 U/μL; *Fermentas*) e a solução tampão *Tango* (2x conc.; *Thermo Scientific*) de modo a verificar a correta inserção do fragmento de ADN de interesse no vetor.

Componentes	Volumes (μL)
Vetor pET-22b(+) + fragmento de ADN de interesse	3,5
<i>EcoRI</i> (10 U/μL)	0,25
<i>XhoI</i> (10 U/μL)	0,25
Solução tampão <i>Tango</i> (2x conc.)	2
H <sub>2</sub> O até 10 μL	

#### II.2.1.6. Preparação de meios de cultura

Para preparar o meio de cultura LB (do inglês, *Luria Broth*; 10 g/L Bactotripton, 5 g/L Extrato de levedura, 10 g/L NaCl, pH 7,0), dissolveu-se LB em água destilada numa razão de 1:40 (LB:dH<sub>2</sub>O) (m/V). No caso dos meios de cultura conterem também agar, este é adicionado à solução anterior numa razão de 1:50 (m/V). Ambas as soluções são preparadas em frascos de *Schott*.

De seguida, o meio de cultura foi autoclavado a 120 °C, durante 20 minutos e armazenado à temperatura ambiente.

Sempre que necessário, adicionou-se 0,1% (V/V) de ampicilina ([Amp]<sub>stock</sub> = 100 mg/mL) aos meios de cultura, tomando as devidas precauções, uma vez que temperaturas elevadas promovem a inativação do antibiótico.

#### II.2.1.7. Transformação de células competentes

A transformação de bactérias consiste na introdução de um vetor plasmídico, que contenha o gene de interesse em bactérias desprovidas de qualquer ADN desta natureza (bactérias competentes). O objetivo desta técnica consiste em obter milhares de cópias do vetor introduzido na bactéria e, assim, do gene de interesse<sup>96,97</sup>.

##### II.2.1.7.1. Obtenção de células competentes

Para se obter as células competentes *One Shot® BL21(DE3)* e *One Shot® TOP10* (*Invitrogen*) inoculou-se 5 mL de meio LB com 5 μL de células e incubou-se durante, aproximadamente, 16 horas a 37 °C, 210 rpm. De seguida, inoculou-se 100 μL de cultivo em 5 mL de meio LB, deixou-se as bactérias crescerem na incubadora a 37 °C, 210 rpm e monitorizou-se o crescimento através da leitura da densidade ótica (D.O.) num espectrofotómetro (*Shimadzu UV-160A*) a um comprimento de onda de 600 nm (D.O.<sub>600 nm</sub>).

A leitura da densidade ótica é realizada a 600 nm porque os microrganismos podem conter inúmeras macromoléculas que absorvem a luz, incluindo ADN (254 nm), proteínas (280 nm), citocromos (400 – 500 nm) e possíveis pigmentos celulares. Ao medir a densidade ótica das bactérias por dispersão de luz, o ideal é escolher um comprimento de onda onde a absorção é mínima e, para a maioria das culturas bacterianas, os comprimentos de onda em torno de 600 nm são uma boa escolha. Em bactérias a este comprimento de onda a absorção é mínima, de modo a que seja possível medir a dispersão de luz de amostras turvas, que é proporcional à densidade celular<sup>98</sup>.

Quando a  $D.O_{600\text{ nm}} \approx 0,3$ , transferiu-se as células para tubos de 2 mL estéreis, e centrifugou-se durante 10 minutos a 825 xg (à temperatura ambiente). De seguida, desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se ao sedimento, aproximadamente, 2 mL de 0,1 M  $CaCl_2$  autoclavado e gelado (0 °C) e ressuspendeu-se gentilmente. Incubaram-se as bactérias ressuspendidas durante 20 minutos no gelo e centrifugou-se durante 10 minutos a 825 xg, adicionou-se 0,5 mL de 0,1 M  $CaCl_2$  autoclavado e gelado (0 °C) com 15% de glicerol (para posterior armazenamento a -80 °C) ao sedimento e ressuspendeu-se gentilmente. Após este processo, as células encontram-se prontas para serem transformadas. Por fim, fizeram-se alíquotas de 50 ou 100 µL, em tubos de 1,5 mL e armazenou-se a -80 °C, para que toda a composição das células permanecesse inalterada, preservando a sua competência e para que a sua viabilidade fosse mantida por tempo indefinido<sup>99</sup>.

#### II.2.1.7.2. Reação de Transformação

As células competentes *One Shot® BL21(DE3)* (*Invitrogen*) são ideais para utilizações em sistemas de expressão baseados no promotor do bacteriófago T7 (por exemplo pET) que foi modificado para conter um operão lac. Para a expressão do gene, é necessário o suprimento com a *T7 RNA Polymerase*, fornecido pela estirpe *E. coli BL21(DE3)*, que, quando se encontra em quantidade suficiente, se liga ao promotor T7 e transcreve o ADN clonado no vetor pET, produzindo grandes quantidades de ARNm (ARN mensageiro) que é, então, utilizado pela bactéria para produzir grandes quantidades da proteína recombinante<sup>100</sup>. As proteínas recombinantes que não são tóxicas para *E. coli* são geralmente expressas em níveis mais elevados em células *BL21(DE3)* do que noutro tipo de células da estirpe *BL21*.

A bactéria *BL21(DE3)* é uma estirpe lisogénica obtida pela infeção da estirpe *E. coli BL21* pelo fago *DE3*, um derivado do fago  $\lambda$ , que contém clonado o gene da *T7 RNA Polymerase* sob o controlo do promotor lacUV5, sendo capaz de produzir a *T7 RNA Polymerase*, quando o promotor lacUV5 é induzido com IPTG adicionado ao meio de cultura.

As estirpes *BL21* têm dois atributos importantes que as tornam ideais para a expressão da proteína: marcadores genéticos importantes e indutibilidade da expressão da proteína. Os marcadores genéticos mais importantes ajudam o ARN e/ou proteínas recombinantes a

acumularem-se até níveis elevados sem degradação, enquanto a indutibilidade ajuda a minimizar os efeitos tóxicos de algumas proteínas recombinantes<sup>101</sup>.

As células competentes *One Shot® TOP10 (Invitrogen)* são ideais para a clonagem de alta eficiência e propagação de plasmídeo. Permitem a replicação estável de plasmídeos de elevado número de cópias (*high-copy number*). Estas células maximizam a eficiência de clonagem num único tubo e proporcionam maior capacidade de clonagem de ADN plasmídico<sup>102</sup>.

Para além das células *One Shot® BL21(DE3)* e *One Shot® TOP10 (Invitrogen)* tornadas competentes da forma acima indicada, nas reações de transformação foram também utilizadas as células competentes *NovaBlue GigaSingles™ (Novagen)*.

As células competentes *NovaBlue GigaSingles™ (Novagen)* produzem mais de  $1 \times 10^9$  cfu/ $\mu$ g de ADN plasmídico (do inglês, *colony-forming unit*, unidades formadoras de colónias; refere-se à viabilidade das bactérias), sendo ideais para clonagem de alta eficiência, pois permitem a preparação de ADN plasmídico de alta qualidade, são fáceis de utilizar neste formato e são preparadas utilizando um método químico otimizado<sup>103</sup>.

Deste modo, para transformar as células competentes *One Shot® BL21(DE3)* e *One Shot® TOP10 (Invitrogen)* descongelou-se uma alíquota das mesmas em gelo e, à chama, adicionou-se 1  $\mu$ L de plasmídeo a 50  $\mu$ L de células competentes *One Shot® BL21(DE3)* ou *One Shot® TOP10 (Invitrogen)*.

Incubou-se a reação no gelo durante, aproximadamente, 30 minutos. De seguida, submeteram-se as células a um choque térmico num banho a 42 °C durante 40 segundos, sem agitar; transferiu-se imediatamente a reação para o gelo e incubou-se durante 2 minutos; adicionou-se mais 200  $\mu$ L de meio de cultura SOC (20 g/L Bactotripton, 5 g/L Extrato de Levedura, 10 g/L NaCl, 0,19 g/L KCl, 2,0 g/L MgCl<sub>2</sub> e 3,6 g/L Glucose) à temperatura ambiente; incubou-se numa incubadora (*HT Infors*) com agitação orbital, a 37 °C, 210 rpm, durante 60 minutos e, por fim, plaqueou-se diferentes volumes (100 e 150  $\mu$ L) do produto de transformação em placas de LB-agar suplementadas com Ampicilina (100  $\mu$ g/mL, para seleção do plasmídeo) e colocou-se as mesmas na estufa durante 16 a 18 horas, a 37 °C.

Por outro lado para transformar as células competentes *NovaBlue GigaSingles™ (Novagen)* descongelou-se uma alíquota das mesmas em gelo (25  $\mu$ L) e adicionou-se 7  $\mu$ L do produto da reação de ligação (ver secção II.2.1.5. dos Materiais e Métodos).

Incubou-se a reação no gelo durante aproximadamente 5 minutos. De seguida, submeteram-se as células a um choque térmico num banho a 42 °C durante 30 segundos, sem agitar; transferiu-se imediatamente a reação para o gelo e incubou-se durante 2 minutos; adicionou-se mais 250  $\mu$ L de meio de cultura SOC à temperatura ambiente; incubou-se numa incubadora (*HT Infors*) com agitação orbital, a 37 °C, 210 rpm, durante 30 minutos e, por fim, plaqueou-se diferentes volumes (100 e 180  $\mu$ L) do produto de transformação em placas de LB-agar/Amp e colocou-se as mesmas na estufa durante 16 a 18 horas, a 37 °C.

A inserção do vetor produzido em células *One Shot*<sup>®</sup> por transformação e o crescimento em meio sólido LB/Amp possibilita o aparecimento de colônias bacterianas de cor branca.

A ampicilina foi utilizada pois permite a seleção das bactérias transformadas: apenas as bactérias transformadas, ou seja, que possuam o vetor plasmídico no seu interior, apresentam resistência a este antibiótico.

### **II.2.1.8. Isolamento de ADN plasmídico**

Para se isolar o ADN plasmídico utilizou-se o *kit* comercial (*NZYMiniprep kit – nzytech*). Este método utiliza uma coluna de afinidade que se baseia na lise alcalina, sendo que a purificação do ADN é efetuada por passagem da mistura por uma coluna contendo uma resina insolúvel que tem a propriedade de fixar seletivamente o ADN. Por lavagens da resina com uma solução com etanol, para o manter insolubilizado, purifica-se o ADN, que é, posteriormente, eluído com água<sup>104</sup>.

De acordo com o protocolo do fornecedor, sedimentou-se aproximadamente 5 mL de cultura de células, contendo o plasmídeo que se pretendia isolar, num tubo de 1,5 mL através de centrifugação, durante 40 segundos a 14 324 xg numa microcentrifuga (*1-15P Sartorius, Sigma*, rotor 12124), eliminando-se o sobrenadante.

Posteriormente, para ocorrer a lise celular, ressuspendeu-se as células em 250 µL do tampão A1<sup>3</sup>, misturando-se vigorosamente. Adicionou-se 250 µL do tampão A2<sup>4</sup>, misturou-se delicadamente, invertendo o tubo 6 a 8 vezes, e incubou-se à temperatura ambiente durante, no máximo, 4 minutos.

Neutralizou-se a solução adicionando 300 µL de tampão A3<sup>5</sup> e misturou-se gentilmente, invertendo o tubo 6 a 8 vezes, e centrifugou-se a mistura à temperatura ambiente, durante 10 minutos a 14 324 xg.

Colocou-se a coluna *NZYtech* num tubo de recolha de 2 mL, aplicou-se o sobrenadante proveniente da última centrifugação na coluna e centrifugou-se durante 1 minuto a 14 324 xg; esvaziou-se o tubo de recolha e reintroduziu-se a coluna. Para lavar a membrana de sílica da coluna, adicionou-se 500 µL de tampão AY<sup>6</sup>, centrifugou-se a 14 324 xg durante 1 minuto e esvaziou-se o tubo coletor. Adicionou-se 600 µL do tampão A4<sup>7</sup>, centrifugou-se a 14 324 xg durante 1 minuto, esvaziou-se novamente o tubo coletor e centrifugou-se mais uma vez, a 14 324 xg, durante 2 minutos, de modo a eliminar vestígios do tampão A4 e secar a membrana de sílica da coluna.

---

<sup>3</sup> Tampão A1 – 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL ribonuclease.

<sup>4</sup> Tampão A2 – 200 mM NaOH, 1% p/V SDS.

<sup>5</sup> Tampão A3 – acetato e hidrocloreto de guanidina.

<sup>6</sup> Tampão AY – hidrocloreto de guanidina.

<sup>7</sup> Tampão A4 – Tris-HCl, NaCl, EDTA e etanol

Para eluir o ADN, colocou-se a coluna num novo tubo de 1,5 mL e adicionou-se 30 µL de água estéril, a uma temperatura de aproximadamente 60 °C, no centro da coluna. Incubou-se 1 minuto à temperatura ambiente, centrifugou-se a 14 324 xg durante 1 minuto e, para o rendimento ser maior, voltou a colocar-se o volume eluído na coluna e centrifugou-se a 14 324 xg durante 2 minutos. Por fim, analisou-se o resultado em eletroforese de gel de agarose a 0,8% (ver secção II.2.1.3. dos Materiais e Métodos).

Após a obtenção do ADN plasmídico, procedeu-se, então, à digestão total do mesmo com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*, de acordo com o procedimento descrito nas secções II.2.1.4.1. e II.2.1.5. dos Materiais e Métodos, tendo como objetivo garantir que, após a ligação do fragmento de ADN de interesse ao vetor de expressão pET-22b(+), transformação em células competentes *NovaBlue GigaSingles*<sup>TM</sup> e obtenção do ADN plasmídico, o fragmento de ADN de interesse estava inserido corretamente no vetor pET-22b(+) para que, posteriormente, fosse possível enviar para sequenciação (*StabVida*). O resultado foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1% (ver secção II.2.1.3. dos Materiais e Métodos).

## **II.2.2. Sobre-expressão da MreB de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus***

### **II.2.2.1. Testes de expressão**

Para se saber quais as condições ótimas de crescimento, selecionou-se uma colónia transformante [células *One Shot® BL21(DE3)* contendo o plasmídeo de interesse (pET-22b(+) + gene de MreB)] para o pré-inóculo em 50 mL de meio de cultura LB (*nzytech*), contendo 0,1% (V/V) de ampicilina ([Amp]<sub>stock</sub> = 100 mg/mL) e, posteriormente, incubou-se numa incubadora (*HT Infors*) com agitação orbital, a 37 °C, 210 rpm, durante aproximadamente 16 horas. Posteriormente, inoculou-se 1 mL do pré-inóculo em 50 mL de LB, incubou-se a 37 °C, 210 rpm, durante aproximadamente 2 horas, e monitorizou-se o crescimento através da leitura da densidade ótica a 600 nm no espectrofotómetro (*Shimadzu UV-160A*). Quando a D.O.<sub>600 nm</sub> ≈ 0,6, removeram-se as células, induziu-se com diferentes concentrações de IPTG (0; 0,1; 0,5; 1 mM) e incubou-se a 25 ou 37 °C, 190 rpm, monitorizando-se, mais uma vez, o crescimento através da leitura da D.O.<sub>600 nm</sub>, de hora a hora, até às 7 horas, e, por fim, 22 horas após indução com IPTG. Repetiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente, realizando-se a indução quando a D.O.<sub>600 nm</sub> ≈ 1,5. Recolheram-se amostras a cada instante, as quais foram, de seguida, analisadas por eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, de modo a determinar quais as condições ótimas em que a proteína MreB é expressa.

### **II.2.2.2. Eletroforese de proteínas em géis de poliacrilamida**

#### **II.2.2.2.1. Eletroforese em condições desnaturantes**

Os géis de poliacrilamida realizados em condições desnaturantes (SDS-PAGE, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), em solução tampão Tris-Tricina, foram preparados como descrito no Anexo I, Tabela AI.I., sendo o gel de separação constituído por uma solução de acrilamida/bisacrilamida (*Merck*) a 12,5% (m/V) e o gel de concentração por 4% (m/V) dessa mesma solução.

As amostras e o marcador de massas moleculares [constituído por uma mistura de sete proteínas nativas:  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), Albumina de soro bovino (66,2 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Lactato Desidrogenase (35 kDa), REase Bsp981 (25 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa) e Lisozima (14,4 kDa); *Thermo Scientific*] foram previamente fervidos durante 5 minutos, já com o tampão de amostra adicionado (Anexo I, Tabela AI.II.) e, em seguida, aplicados no gel.

As eletroforeses foram realizadas durante cerca de 1 hora, a 150 V, usando-se uma solução de 0,2 M Tris-HCl, pH 8,9, no compartimento anódico, e outra de 0,1 M Tricina, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,25 e 0,1% SDS (m/V), no compartimento catódico. Após finalizar a eletroforese, os géis foram corados para visualização das bandas de proteína por coloração com Azul de Coomassie (ver secção II.2.2.2.2. do presente capítulo).

#### **II.2.2.2.2. Revelação dos géis**

Os géis foram corados para determinação do conteúdo proteico com uma solução de Azul de Coomassie R-250, durante cerca de 30 minutos, e descorados com uma solução aquosa composta por ácido acético glacial a 7,5% (V/V) e metanol a 45% (V/V). Os géis, depois de corados e descorados, o que permite a revelação das amostras proteicas separadas de acordo com a sua massa molecular, foram fotografados sob luz branca num transiluminador (*VWR, GenoSmart*) com sistema de documentação de gel.

### **II.2.3. Purificação da MreB de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus***

#### **II.2.3.1. Condições de Crescimento**

Determinadas as condições ótimas de sobre-expressão da MreB, realizou-se um crescimento em larga escala, de modo a obter quantidades de proteína adequadas ao desenvolvimento dos estudos subsequentes de caracterização.

Deste modo, selecionou-se uma colónia transformante para o pré-inóculo em 150 mL de meio de cultura LB (*nzytech*), contendo 0,1% (V/V) de ampicilina ( $[Amp]_{stock} = 100 \text{ mg/mL}$ ) e, posteriormente, incubou-se numa incubadora (*HT Infors*) com agitação orbital, a 37 °C, 210

*rpm*, durante aproximadamente 16 horas. Para o crescimento foram preparados 6 L do mesmo meio de cultura, que foram inoculados com a cultura bacteriana numa diluição de 1:50. A cultura celular foi incubada durante, aproximadamente, 4 horas, a 37 °C, 210 *rpm*, até a D.O.<sub>600 nm</sub> ≈ 0,6, altura em que se induziu com 0,5 mM de IPTG e se alterou a agitação para 190 *rpm*. Recolheram-se amostras ao longo do tempo (de hora a hora), para registo da densidade ótica a 600 nm (D.O.<sub>600 nm</sub>).

A massa celular foi recolhida por centrifugação, após 26 horas, numa centrífuga *BECKMAN COULTER™* (*Avanti® J-26 XPI*), rotor JA-10, a 6 371 *xg*, durante 8 minutos e à temperatura de 6 °C. As células foram ressuspensas em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>, numa proporção aproximada de 0,5 gramas de células/mL de solução tampão, e armazenadas a -80 °C durante, aproximadamente, 30 minutos, enquanto o sobrenadante foi descartado.

De seguida, a massa celular obtida anteriormente foi descongelada e partiram-se as células com o auxílio da *French Press* (*Thermo scientific*), a 1250 *psi*.

A *French Press* é utilizada para isolamento de proteínas e outros componentes celulares. Neste equipamento, a célula de pressão rompe as paredes celulares e a membrana plasmática de uma amostra, deixando o núcleo da célula intacto, o que resulta numa disrupção uniforme e completa.

A amostra obtida no passo anterior foi, ainda, ultracentrifugada numa ultracentrífuga *BECKMAN COULTER™* (rotor 45 Ti), a 138 000 *xg*, durante 1 hora e 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante (fração citoplasmática) foi, posteriormente, utilizado para purificar a proteína em estudo, a MreB.

### **II.2.3.2. Purificação da MreB**

Todo o procedimento de purificação foi efetuado a 4 °C, utilizando um sistema de *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) *AKTApri™ plus* (*GE Healthcare*) e a absorvância foi monitorizada ao comprimento de onda de 280 nm.

A fração citoplasmática obtida como descrito anteriormente (ver secção II.2.3.1.), contendo a MreB, foi purificada através de uma cromatografia de troca aniónica, onde as proteínas são separadas de acordo com a sua carga, usando como fase estacionária, ou resina, a *DEAE Fast Flow* (*GE Healthcare*) (dimensões da coluna = 33 cm x 2,6 cm Ø, aproximadamente 180 mL), que contém grupos carregados positivamente, ideal para separar proteínas carregadas negativamente. A resina foi equilibrada com três volumes de coluna de 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM CaCl<sub>2</sub> e a fração foi aplicada a um caudal de 4,0 mL/min. As proteínas existentes na amostra, ao passarem através da coluna empacotada com a resina contendo grupos de carga iónica de sinal oposto, vão ficando adsorvidas a esta, consoante a sua afinidade eletrostática para os grupos funcionais da resina. As proteínas da amostra que

não possuem carga ou cuja carga seja idêntica à da resina não ficam adsorvidas à matriz e são eluídas com o mesmo tampão (de baixa força iônica), antes de se iniciar o gradiente. Para remover as proteínas que ficaram adsorvidas à coluna, aumentou-se gradualmente a força iônica do tampão de eluição, efetuando-se um gradiente salino com NaCl de 0 a 500 mM, em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>, durante aproximadamente 225 min (5 volumes de coluna), a um caudal de 4,0 mL/min. O gradiente salino pode fracionar as proteínas adsorvidas de acordo com a intensidade das suas cargas, que é dada pela diferença entre os seus pontos isoelétricos (pI) e o valor de pH do tampão de eluição<sup>105</sup>.

As frações que continham a MreB foram reunidas e, posteriormente, concentradas através de uma membrana com um poro de 30 000 MWCO (do inglês, **Molecular Weight Cut-Off**, menor massa molecular das proteínas retidas pela membrana) de polietersulfona (PES) (*Vivacell 70*; *Sartorius*), a uma pressão de 3 bar (45 psi), a 4 °C.

No segundo passo de purificação foi utilizada uma cromatografia de exclusão molecular (filtração em gel), onde as proteínas são separadas de acordo com o seu raio hidrodinâmico, usando-se como matriz a *Superdex 75* (*GE Healthcare*) (Dimensões da coluna = 55 cm x 2,6 cm Ø, aproximadamente 290 mL), constituída por grânulos que possuem poros, de dimensões controladas, no seu interior, tendo sido equilibrada com três volumes de coluna de tampão 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>. As proteínas da amostra de pequenas dimensões entram em todos os poros, as de tamanho intermédio entram em alguns poros e as de grandes dimensões são excluídas de todos os poros, sendo eluídas com o mesmo tampão (20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>)<sup>105</sup>.

A presença da proteína MreB nas diferentes frações recolhidas durante o processo de purificação foi confirmada através de géis de poliacrilamida 12,5% (m/V) em condições desnaturantes, corados com Azul de *Coomassie* R-250 (ver composição no Anexo I, Tabela AI.III.), de acordo com o procedimento descrito na secção II.2.2.2.1.

### **II.2.3.3 Quantificação da proteína**

#### **II.2.3.3.1. Método de Lowry**

A quantificação da proteína MreB após purificação foi realizada através do método de *Lowry*, um método colorimétrico caracterizado pela reação do reagente Biureto, reação esta que se traduz na redução do cobre de Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup>. Neste método, a deteção de Cu<sup>+</sup> é realizada através da reação do reagente *Folin-Ciocalteu* (molibdato, tungstato e ácido fosfórico) que, quando reduzido, forma um complexo com forte absorção a um comprimento de onda de 750 nm.

A proteína padrão utilizada foi a albumina de soro bovino (BSA) da *Sigma-Aldrich*®, a partir da qual é possível representar uma reta de calibração numa gama de concentrações



compreendidas entre 0 e 0,30 mg/mL, preparada em água Milli-Q, de acordo com o apresentado no gráfico da Figura III.27. A MreB foi também diluída com água Milli-Q.

O procedimento consiste em adicionar 400 µL do reagente Biureto (composição no Anexo II) a 100 µL de amostra (proteína padrão e amostras em estudo), agitar e incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos. Em seguida, adicionar 3,5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,3% (m/V) (*Panreac*), agitar e adicionar, por fim, 100 µL do reagente *Folin-Ciocalteu* (*Merck*). Agita-se novamente e incuba-se durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Após este período, mede-se a absorvância ao comprimento de onda de 750 nm, ao qual o complexo formado absorve.

A concentração da proteína MreB é determinada por interpolação a partir da reta de calibração obtida a partir dos valores de absorvância das amostras de BSA de diferentes concentrações ( $Abs_{750\text{ nm}} = [MreB] \text{ (mg/mL)} + b$ ).

#### II.2.3.3.2. Método de BCA

O método colorimétrico que utiliza o ácido bicinconínico (BCA) consiste na detecção e quantificação colorimétrica de proteínas totais. Este método combina duas reações: a redução do cobre ( $Cu^{2+} \rightarrow Cu^{+}$ ) pela proteína em meio alcalino (reação de biureto) e a coordenação do íon  $Cu^{+}$  a duas moléculas do reagente BCA, originando uma solução de cor púrpura. A quantidade de cobre que se reduz é proporcional à proteína presente, tendo-se demonstrado que a cisteína, o triptofano, a tirosina, a cistina e a ligação peptídica são capazes de reduzir  $Cu^{2+}$  a  $Cu^{+}$ . O BCA forma um complexo molecular com o  $Cu^{+}$  que exibe um máximo de absorvância a 562 nm.

Para este ensaio foi utilizado o *kit Bicinchoninic Acid Assay* (*Sigma*) de acordo com o protocolo comercial (*Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit* - Product Code: BCA1 AND B9643, *Sigma*). A proteína utilizada como padrão foi a Albumina de Soro Bovino (BSA) preparada com concentrações entre 0 e 0,3 mg/mL a partir da solução *stock* de 2 mg/mL. A todas as amostras (50 µL) foi adicionado 1 mL do reagente BCA (solução 4% (m/V) de sulfato de cobre (II) pentahidratado e a solução de ácido bicinconínico, carbonato de sódio, tartarato de sódio e bicarbonato de sódio em 0,1 N NaOH, pH 11,25, na proporção 1:50) e incubou-se durante 30 min a 37 °C. A leitura da absorvância a 562 nm, utilizando um espectrofotômetro (*Shimadzu UV-160A*), permitiu representar as absorvâncias obtidas em função das concentrações da proteína padrão. A concentração da proteína MreB é, igualmente, determinada por interpolação a partir da reta de calibração obtida a partir dos valores de absorvância das amostras de BSA de diferentes concentrações ( $Abs_{562\text{ nm}} = [MreB] \text{ (mg/mL)} + b$ ).

## II.2.4. Caracterização Bioquímica e Estrutural da MreB

### II.2.4.1. Determinação do Coeficiente de Extinção Molar

Para determinar o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) realizou-se uma titulação, por espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis), de diferentes concentrações de MreB (0; 0,5; 1; 2; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25  $\mu$ M) em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$  e 0,2 mM ATP, tendo-se, de seguida, representado graficamente os valores de absorvância ao comprimento de onda de 280 nm em função das concentrações de MreB, tendo sido o coeficiente de extinção molar determinado a partir da reta  $\text{Abs}_{280 \text{ nm}} = \epsilon \times [\text{MreB}] \times b$  (onde  $b$  representa o percurso ótico, sendo, neste caso, igual a 1 cm).

### II.2.4.2. Determinação da massa molecular

#### II.2.4.2.1. Cromatografia de Filtração em Gel

A massa molecular da MreB foi determinada por cromatografia de exclusão molecular, utilizando uma coluna *Superdex 200 10/300 GL* (GE Healthcare) equilibrada com 50 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 150 mM NaCl a um fluxo de 0,5 mL/min.

Para o efeito, foram usadas proteínas padrão, constituintes do *kit* de calibração de filtração em gel (GE Healthcare), cuja massa molecular é conhecida, preparadas de acordo com o protocolo fornecido pela marca (Tabela II.VIII.). Para esse fim, foram realizadas duas misturas de padrões: *Mix A* – Ribonuclease A / Ovalbumina / Aldolase e *Mix B* – Ribonuclease A / Conalbumina / Ferritina.

**Tabela II.VIII.** Proteínas do *kit* de calibração de filtração em gel (*HMW* e *LMW* da GE Healthcare), utilizadas para obtenção da reta de calibração para determinação da massa molecular aparente da MreB.

Proteínas	Massa Molecular (Da)	Concentração (mg/mL)
Ribonuclease A	13 700	3
Ovalbumina	43 000	4
Conalbumina	75 000	3
Aldolase	158 000	4
Ferritina	440 000	0,3

A eluição das proteínas padrão (100  $\mu$ L de cada mistura) e da MreB (100  $\mu$ L, aproximadamente 2 nmol) foi efetuada na mesma solução tampão, a 0,5 mL/min. Para a determinação do volume “morto” da coluna, foi eluída, separadamente, uma amostra de Azul de Dextrano, o qual, por possuir uma massa molecular bastante elevada (cerca de 2 000 kDa), não consegue penetrar nos poros da matriz, sendo automaticamente eluído.

Para o cálculo da massa molecular foi representado o  $K_{av}$  (coeficiente de distribuição da proteína entre as fases cromatográficas, móvel e estacionária) em função do logaritmo das massas moleculares das proteínas padrão.

O  $K_{av}$  foi determinado utilizando a seguinte fórmula:  $K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$ ,

onde,  $V_e$  = volume de eluição da proteína;  $V_0$  = volume “morto” da coluna (igual ao volume de eluição do Azul de Dextrano 2000);  $V_t$  = volume total da coluna.

Os volumes de eluição foram obtidos determinando o volume de solvente eluído entre o ponto de injeção e o ponto de altura máxima do pico correspondente à eluição das proteínas utilizadas (proteínas padrão e MreB).

#### II.2.4.2.2. Gel de SDS-PAGE

Para determinar a massa molecular da MreB através do gel de SDS-PAGE o primeiro passo consistiu na aplicação da amostra de proteína e de um marcador de massas moleculares padrão [ $\beta$ -galactosidase (116 kDa), Albumina de soro bovino (66,2 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Lactato Desidrogenase (35 kDa), REase Bsp981 (25 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa) e Lisozima (14,4 kDa); *Thermo Scientific*]. De seguida, representou-se graficamente o logaritmo de massas moleculares ( $\log(MM)$ ) em função da distância de migração relativa ( $R_f$ ) com base nos valores obtidos para as bandas das massas moleculares padrão.

O  $R_f$  é definido como a distância de migração da proteína através do gel dividido pela distância de migração da frente de solvente. A distância é medida a partir do topo do gel de resolução até à banda de interesse. O gráfico do  $\log(MM)$  em função de  $R_f$  foi obtido a partir das bandas correspondentes às proteínas presentes no marcador de massas moleculares. A massa molecular da banda da proteína MreB foi, então, calculada por interpolação usando a equação da reta  $y = mx + b$ , onde  $y$  corresponde ao  $\log(MM)$ ,  $m$  ao declive,  $x$  ao  $R_f$  e  $b$  à interceção com o eixo  $yy$ .

#### II.2.4.3. Medição da polimerização de MreB por dispersão de luz

Os ensaios de polimerização da proteína MreB, realizados por dispersão de luz, foram realizados num espectralfluorímetro *LS 45 Perkin Elmer*, com ambos os monocromadores posicionados a 546 nm<sup>106</sup>, sendo de 90° o ângulo formado entre a luz incidente e a luz emitida.

A polimerização da MreB foi monitorizada em tempo real (através do programa informático *FL WinLab; Time Drive*) e com agitação contínua, à temperatura ambiente. Analisou-se o efeito de diferentes concentrações de MreB (0; 0,5; 1; 2; 4; 8  $\mu$ M), KCl (0; 25; 50; 75; 100; 200 mM) e ATP (0; 1; 2; 4 mM). A reação foi seguida até se atingir um patamar na intensidade da luz emitida, sendo que a linha de base foi obtida a partir do sinal da solução

tampão 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ . A polimerização foi iniciada (aos 200 segundos) pela adição de 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , ATP e KCl, sendo que a concentração final destes dois últimos foi variável consoante o parâmetro em análise. No entanto, e para que fosse possível estabelecer uma comparação entre os diferentes ensaios, determinou-se que a condição padrão correspondia a 4  $\mu\text{M}$  MreB, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM KCl e 2 mM ATP.

#### **II.2.4.4. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ de MreB**

Os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de MreB, na ausência e na presença de diferentes nucleótidos (em 20 mM Tris-HCl, 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$  e 0,2 mM ATP), foram adquiridos a uma temperatura de 25 °C num espectrómetro *Bruker Avance III* 400 MHz equipado com uma unidade de controlo de temperatura. Por espectro acumularam-se 16 *FIDs* (do inglês, *free-induction decays*), com uma pausa entre *scans* de 1,5 s. A ressonância da água (4,7 ppm) foi suprimida usando a sequência de pulsos *zgesgp*, na qual se obtém a supressão do solvente através de pulsos a 180° seletivos para a água. Os espectros foram processados usando o programa *TOPSPIN 2.0* (*Bruker*), multiplicando as *FIDs* por uma função de janela exponencial com largura de linha de 1 Hz. A janela espectral é de 8000 Hz centrada na ressonância da água (4,7 ppm).

#### **II.2.4.5. Ensaios de Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de Transferência de Saturação**

A espectroscopia de RMN-STD (Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de Transferência de Saturação) é utilizada para caracterizar as interações de baixa afinidade ( $K_D \approx 10^{-8} - 10^{-3}$  M) entre pequenas moléculas (ligandos) e proteínas, e baseia-se na transferência intermolecular da magnetização (por difusão de *spin*) da proteína para a molécula ligada através do Efeito Nuclear de *Overhauser* (NOE). Esta transferência de saturação pode ser detetada se existir um equilíbrio rápido entre o estado ligado à proteína e o estado livre do ligando em solução. A transferência de saturação só ocorre para moléculas ligadas à proteína com uma velocidade dependente da mobilidade da proteína, tempo de vida do ligando-proteína e geometria. RMN-STD envolve a saturação seletiva de uma ressonância pertencente à proteína (uma região do espectro que contenha apenas ressonâncias da proteína). Caso o ligando se encontre ligado à proteína, a saturação irá propagar dos prótons da proteína selecionados para os outros prótons da proteína por difusão de *spin* e, por último, a saturação é transferida para os componentes ligados por relaxação cruzada na interface proteína-ligando.

Para se obter os dados correspondentes ao efeito de RMN-STD realiza-se uma experiência de controlo, saturando uma região do espectro que não contém qualquer sinal. O espectro da diferença apresentará apenas às ressonâncias que sofreram saturação, ou seja, as ressonâncias da proteína e do ligando que se liga à proteína. Todas as outras ressonâncias não afetadas pelo processo cancelar-se-ão no espectro de diferença.

Posto isto, para realizar as experiências de RMN-STD foi utilizada a proteína MreB e os diferentes nucleótidos (ATP, CTP e GTP) em tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$  e 0,2 mM ATP. As concentrações finais para proteína e ligando foram de 20  $\mu\text{M}$  e 10 mM, respetivamente. Os espectros dos nucleótidos na ausência de proteína foram adquiridos a 25 °C num espectrómetro *Bruker Avance III* operando a 400 MHz, usando a sequência de pulso *zgesgp*, com 256 *scans* e uma janela espectral de 12019,23 Hz centrada a 1872 Hz. A resolução espectral é de 128k pontos.

Os dados RMN-STD foram adquiridos a 25 °C num espectrómetro *Bruker Avance III* operando a 400 MHz. O espectro foi adquirido com 16 *scans*, numa matriz com 256k pontos em  $t_2$ , para uma janela espectral de 12019,23 Hz (centrada a 1872 Hz, a ressonância da água). A ressonância da água foi suprimida por *excitation sculpting* e gradientes de campo magnético.

A frequência de saturação escolhida (2,94 ppm, *on-resonance*) cinge-se a uma zona onde estão presentes sinais da proteína, mas não de qualquer um dos nucleótidos (que se encontram somente na zona entre 4 e 8,5 ppm, ver Resultados e Discussão, secção III.3.2.). A frequência escolhida como *off-resonance* reflete uma zona do espectro onde não se encontram sinais quer da proteína quer dos ligandos (25 ppm).

A saturação é conseguida através da aplicação de uma série de pulsos Gaussianos de 90° com a frequência especificada (2,94 ou 25 ppm) com duração de 49 ms seguidos de um intervalo de 1 ms, para uma duração total de 2 segundos. A saturação das ressonâncias na experiência *on-resonance* leva à transferência da mesma para outros prótons da molécula através do fenómeno de difusão de *spin*, até toda a proteína idealmente se encontrar saturada. Moléculas de ligando (presentes em grande excesso em solução) que interajam com a proteína saturada terão a probabilidade de ver transferida alguma desta saturação para as suas próprias ressonâncias, permitindo assim mapear o seu epítopo quando comparando o espectro *on-resonance* com o respetivo espectro *off-resonance*.



## Capítulo III Resultados e Discussão

### III.1. Clonagem, Sobre-expressão e Purificação da proteína MreB de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

#### III.1.1. Alinhamento de sequências

A sequência primária da MreB, em aminoácidos, é bastante conservada entre as diferentes espécies. Na Figura III.1. encontra-se representada a sequência da proteína de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. A análise comparativa entre a MreB proveniente de diferentes bactérias, realizada através do programa informático *ClustalW2*, revela uma conservação de cerca de 57%, como se pode observar na Figura III.2. A MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* e a MreB de *E. coli* são as proteínas com maior percentagem de identidade, apresentando cerca de 80% de identidade de sequência, enquanto a MreB de *T. maritima*, a bactéria mais estudada até ao momento, e a MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* são as homólogas que apresentam menor percentagem de identidade, contando apenas com 53%.

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
MLIKRLRGLF SSDLSIDLGT ANTLIYVRER GIVLNEPSVV AIRTNNSQKM VAAVGSEAKR MLGRTPGNIT AIRPMKDGVI ADFVVTEKML

100     110     120     130     140     150     160     170     180
QHFIHKVHEN SFITPSPRVL VCVPSKSTQV ERKAIRESAL GAGAREVFLI EEPMAAAIGA GLPVEEASGS MIVDIGGGTT EIAIISLNGI

190     200     210     220     230     240     250     260     270
VYAESVRVGG DKFDEAIVTY VRRNYGSLIG DSTAERIKHE IGCAYESGLEV REIDVRGRNL AEGVPRAFTL NSEEILDALQ ESLAQIVQTV

280     290     300     310     320     330     340
KSALEQSPPE LASDIAERGI VLTGGGALLR GLDKLISEET GLPVIIAEDP LTCVARGGK ALEVIDRGGI GMFSQEG

```

**Figura III.1.** Sequência primária em aminoácidos da proteína MreB de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. A sequência foi obtida através da base de dados da *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

```

MreB_Marinobacter_hydrocarbono      MLIKRLRLGLFSSDLSDLTANTLIYVRERGIVLNEPSVVAIRTN--NSQ 48
MreB_Escherichia_coli_               -MLKKFRGMFSNDLSIDLGTANTLIYVKGQGVILNEPSVVAIRQDRAGSP 49
MreB_Caulobacter_crescentus_         -MFSSSLFGVISNDIAIDLGTANTLIYQKKGIVLNEPSVVALRNV--GGR 47
MreB_Bacillus_subtilis_              -----MFGIGARDLGLDGTANTLVFVKKGIVVREPSVVALQTD----T 41
MreB_Thermotoga_maritima_             -----MLRKDIGIDLGTANTLVFLRGKGIIVNEPSVIAIDST----T 38
                                     :  * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
MreB_Marinobacter_hydrocarbono      KMVAAVGSEAKRMLGRTPGNITAIRPMKDGVIADFFVTEKMLQHFHKKVH 98
MreB_Escherichia_coli_               KSVAAVGHDAKQMLGRTPGNIAAIRPMKDGVIADFFVTEKMLQHFHKKVH 99
MreB_Caulobacter_crescentus_         KVVHAVGIEAKQMLGRTPGHMEAIRPMRDGVIADFEVAEEMIKYFIRKVVH 97
MreB_Bacillus_subtilis_              KSIVAVGNDAKNMIGRTPGNVVALRPMKDGVIADYETTATMMKYIINQAI 91
MreB_Thermotoga_maritima_            GEILKVGLEAKNMIGKTPATIKAIRPMRDGVIADYTVLVMRLRYFINKAK 88
                                     :  * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
MreB_Marinobacter_hydrocarbono      EN-SFITPSPRVLVCPVPSKSTQVERKAIRSAAGAREVFLIEEPMAAA 147
MreB_Escherichia_coli_               SN-SFMRPSPRVLVCPVPGATQVERRAIRSAQAGAREVFLIEEPMAAA 148
MreB_Caulobacter_crescentus_         NRKGFVN--PKVIVCPVSGATAVERRAINDSCLNAGARRVGLIDEPMAAA 145
MreB_Bacillus_subtilis_              KNKGMFTKPKPYVMVCPVSGITAVEERAVIDATRQAGARDAYPIEEPFAAA 141
MreB_Thermotoga_maritima_            GGMNLFK--PRVVIGVPIGIDVERRAILDAGLEAGASKVFLIEEPMAAA 136
                                     :  * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
MreB_Marinobacter_hydrocarbono      IGAGLPVFEASGSMIVDIGGGTTEIAIISLNGIVYAESVRVGGDKFDEAI 197
MreB_Escherichia_coli_               IGAGLPVSEATGSMVVDIGGGTEVAVISLNGVVYSSSVRIGGDRFDEAI 198
MreB_Caulobacter_crescentus_         IGAGLPVSEATGSMVVDIGGGTEVAVISLNGVVYSSSVRIGGDRFDEAI 195
MreB_Bacillus_subtilis_              IGANLPVWEPTGSMVVDIGGGTEVAVISLNGVVYSSSVRIGGDRFDEAI 191
MreB_Thermotoga_maritima_            IGSNINVEPSGSMVVDIGGGTEVAVISLNGVVYSSSVRIGGDRFDEAI 186
                                     ** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
MreB_Marinobacter_hydrocarbono      VTYVRNRYGSLIGDSTAERIKHEIGCAYEGL--EVREIDVRGRNLAEGVP 245
MreB_Escherichia_coli_               INYVRNRYGSLIGDSTAERIKHEIGCAYEGL--EVREIDVRGRNLAEGVP 246
MreB_Caulobacter_crescentus_         ISYMRHNNLLIGETTAERIKHEIGCAYEGL--EVREIDVRGRNLAEGVP 245
MreB_Bacillus_subtilis_              INYIRKTYNLMIGDRTAEAIKHEIGSAEAE--ESDNMEIRGRDLTGLP 239
MreB_Thermotoga_maritima_            VQYVRETYRVAIGERTAEVKIEIGNVFPSKENDELETTVSGIDLSTGLP 236
                                     :  * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
MreB_Marinobacter_hydrocarbono      RAFTLNSEELDALQESLAQIVQTVKSALEQSPPELASDIAERGVLTGG 295
MreB_Escherichia_coli_               RGFTLNSEELDALQESLAQIVQTVKSALEQSPPELASDIAERGVLTGG 296
MreB_Caulobacter_crescentus_         REVRISERQAADALAEVPGQIVAVKVALEATPPELASDIAERGVLTGG 295
MreB_Bacillus_subtilis_              KTIETITKEISNALRDTVSTIVEAVKSTLEKTPPELAADIMDRGVLTGG 289
MreB_Thermotoga_maritima_            RKLTILKGGVREALRSVVAIVESVRITTEKTPPELVSDIIRGVLTGG 286
                                     :  * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
MreB_Marinobacter_hydrocarbono      GALLRGLDKLISEETGLPVIIEADPLTCVARGGGKALEVIDRGGIGMFSQ 345
MreB_Escherichia_coli_               GALLRNLDRLLMEETGIPVVVAEDPLTCVARGGGKALEVIDRGGIGMFSQ 346
MreB_Caulobacter_crescentus_         GALLRGLDAEIRDHTGLPVTVADDPLSCVALGCGKVLHPKMMKGVLEST 345
MreB_Bacillus_subtilis_              GALLRNLDKVISEETKMPVLIADPLDCVAGTGKALEHILHFKGKTR-- 337
MreB_Thermotoga_maritima_            GSLLRGLDILLQKETGISVIRSEEPLTAVAKGAGMVLDKVNILKKLQAG 336
                                     * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
MreB_Marinobacter_hydrocarbono      EG 347
MreB_Escherichia_coli_               E- 347
MreB_Caulobacter_crescentus_         LA 347
MreB_Bacillus_subtilis_              --
MreB_Thermotoga_maritima_            --

```

**Figura III.2.** Alinhamento das sequências em resíduos de aminoácidos da MreB de várias bactérias, através do programa informático *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). As sequências foram obtidas através da base de dados da *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Por outro lado, as sequências em aminoácidos da MreB da *M. hydrocarbonoclasticus* e a  $\alpha$ -actina do músculo-esquelético de humano (*Homo sapiens*) apresentam uma identidade de cerca de 14% (Figura III.3.), inferior a 20% de identidade, o que geralmente é utilizado como base para estabelecer homólogos. Porém, a MreB contém cinco motivos de sequência conservados que foram previstos para determinar um *fold* tridimensional semelhante ao da



actina<sup>107</sup>. Este alinhamento permitiu, ainda, concluir que existe alguma homologia entre a proteína MreB de procariotas e a actina de eucariotas.

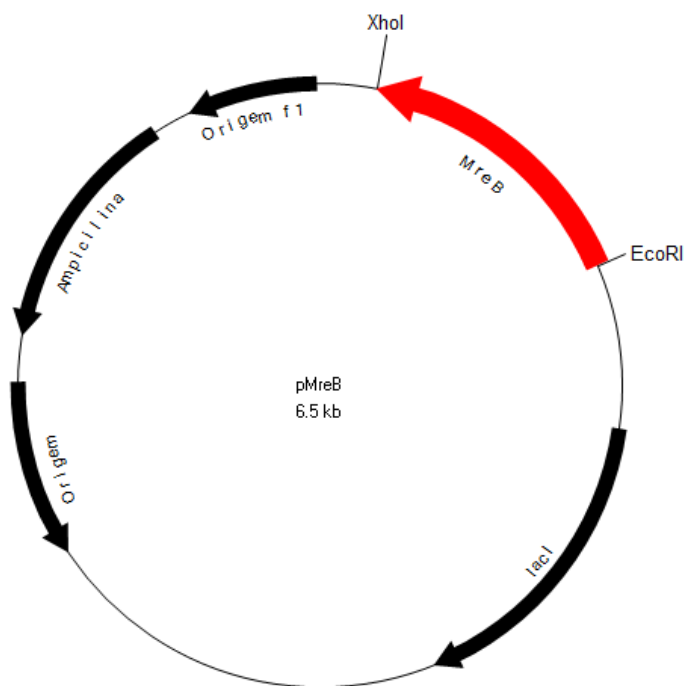


**Figura III.3.** Alinhamento das seqüências em aminoácidos correspondentes à proteína MreB da bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* e à  $\alpha$ -actina de músculo-esquelético humano (*Homo sapiens*), através do programa informático *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). As seqüências foram obtidas através da base de dados da *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### III.1.2. Clonagem da seqüência codificante da proteína MreB de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* no vetor de expressão pET-22b(+)

#### III.1.2.1. Obtenção do ADN da MreB com as zonas de restrição das enzimas *EcoRI* e *XhoI*

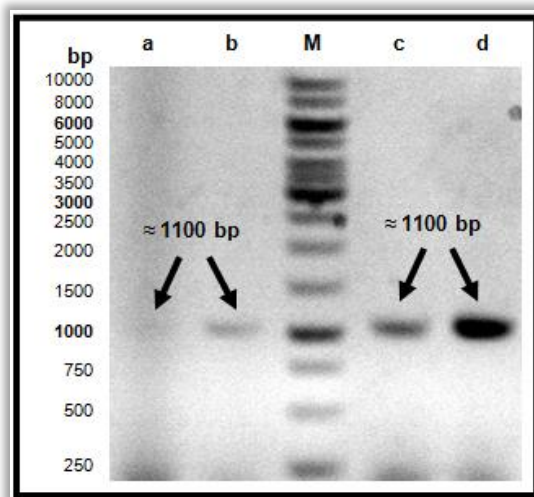
Para que fosse possível clonar a seqüência codificante do gene da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* no vetor de expressão pET-22b(+), de modo a poder sobre-expressar a proteína de interesse, foi necessário proceder à introdução, no fragmento genético contendo a seqüência de interesse, das zonas de hidrólise específicas das enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*, de forma a que, com a respetiva hidrólise, sejam formadas extremidades coesivas, para posterior ligação ao vetor de expressão pET-22b(+). Este, por sua vez, será igualmente hidrolisado pelas mesmas enzimas. Na Figura III.4. é possível observar, esquematicamente, o vetor de expressão pET-22b(+) com o fragmento de interesse e as zonas de hidrólise específicas das enzimas *EcoRI* e *XhoI*.



**Figura III.4.** Representação esquemática do vetor de expressão pET-22b(+) com o fragmento de ADN da MreB inserido no mesmo (representado a vermelho) entre o local de restrição das enzimas *EcoRI* e *XhoI*. A imagem foi reproduzida utilizando o software *BVTech Plasmid*.

Deste modo, foi necessário desenhar os oligonucleótidos iniciadores MreB\_FWD (5'–CCGGAATTCAATGTTAATCAAAGACTCCGAGG–3') e MreB\_RVS (5'–CCAGCTCGAGTCATTACCCCTCCTGGGAGAAC–3'), tendo estes sido posteriormente utilizados nas reações de PCR descritas na Tabela II.I., de acordo com o programa de amplificação descrito na Tabela II.II., ambas apresentadas na secção II.2.1.2. dos Materiais e Métodos.

Realizaram-se quatro reações de amplificação, sendo que, em duas destas, o  $MgCl_2$  presente é apenas o existente na solução tampão (1,5 mM), enquanto nas outras duas foi adicionado 1,5 mM  $MgCl_2$ . Os produtos resultantes destas reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (ver ponto II.2.1.3. da secção Materiais e Métodos), sendo possível a visualização clara e distinta de duas bandas no gel, a aproximadamente 1100 pares de base (bp), correspondentes ao produto das reações de PCR das amostras às quais não foi adicionado  $MgCl_2$  (c e d), e duas bandas mais tênues (a e b), correspondentes ao produto das reações de PCR das amostras às quais foi adicionado  $MgCl_2$  para além do presente na solução tampão (Figura III.5.).



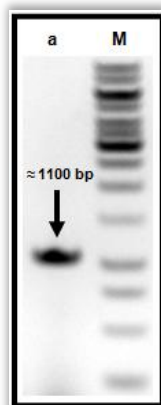
**Figura III.5.** Gel de agarose (0,8%) correspondente aos produtos das reações de PCR utilizada para amplificação da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*. As reações foram realizadas com e sem adição de 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (GE Healthcare), à esquerda e direita do marcador de massas moleculares (M) (Fermentas), respetivamente. Utilizou-se ADN genómico (a) e (c) ou uma colónia de *M. hydrocarbonoclasticus* (b) e (d) como ADN molde, tendo sido utilizados 0,2 mM dNTP's, 1 µM primers e a enzima *Taq DNA Polymerase* (V<sub>i</sub> = 25 µL, em solução tampão 1x conc.). Em todos os casos, foram adicionados 5 µL de amostra e 5 µL de tampão de amostra. A eletroforese decorreu a 100 V, durante aproximadamente 20 minutos.

O aparecimento de uma banda a aproximadamente 1100 pares de base (bp) significa a correta amplificação do fragmento de ADN de interesse, o que resulta do facto da sequência primária da MreB possuir 347 aminoácidos (Figura III.1.), cada um destes codificado por três nucleótidos, apresentando no total uma sequência com 1044 nucleótidos, incluindo o codão *stop*, que formam 1044 pares de base com a cadeia simétrica.

A partir deste resultado é possível concluir que, para amplificar o gene que codifica a proteína MreB, não é necessária a adição de MgCl<sub>2</sub>, para além do existente na solução tampão (1,5 mM), uma vez que as bandas são mais intensas nas reações de PCR às quais não foi adicionado MgCl<sub>2</sub>. Além disso, o produto da reação de PCR foi obtido em maior quantidade nas amostras às quais foi adicionada uma colónia de *M. hydrocarbonoclasticus* diretamente ao meio reacional (b e d) em vez de ADN genómico (a e c).

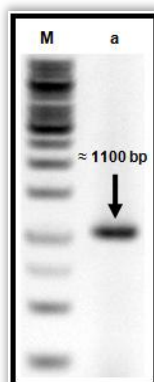
Estabelecidas as condições ótimas para a amplificação da sequência codificante da proteína MreB, realizou-se um *scale up* da reação de PCR, utilizando, então, uma colónia e a enzima *HF Taq DNA Polymerase* do kit comercial *Expand Long Range, dNTPack* (Roche) em substituição da *Taq DNA Polymerase*, uma vez que a enzima *HF Taq DNA Polymerase* possui uma fidelidade três vezes maior do que a *Taq DNA Polymerase*<sup>108,109</sup>. Ou seja, a *HF Taq DNA Polymerase* possui um mecanismo de correção (*proofreading*), que consiste numa atividade exonucleásica no sentido 3' – 5', permitindo-lhe a correção de nucleótidos errados que possam ter sido incorporados durante a reação de PCR<sup>110,111</sup>. O produto resultante desta reação de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose (ver ponto II.2.1.3. da secção Materiais e Métodos), sendo possível a visualização clara e distinta de uma banda, a aproximadamente

1100 pares de base, correspondente ao fragmento de ADN de interesse amplificado (Figura III.6.).



**Figura III.6.** Gel de agarose (0,8%) correspondente ao produto da reação de PCR utilizada para amplificação da MreB de *M.hydrocarbonoclasticus*. (a) A reação foi realizada utilizando 0,2 mM dNTP's, 1  $\mu$ M *primers*, 1 colônia de *M.hydrocarbonoclasticus* e a enzima *HF Taq DNA Polymerase* ( $V_i$  = 50  $\mu$ L em solução tampão 1x conc.), (M) marcador de massas moleculares (*Fermentas*). Aplicaram-se 5  $\mu$ L de cada amostra (a) e (M), às quais se adicionou 5  $\mu$ L de tampão de amostra. A eletroforese decorreu durante aproximadamente 20 minutos, a 100 V.

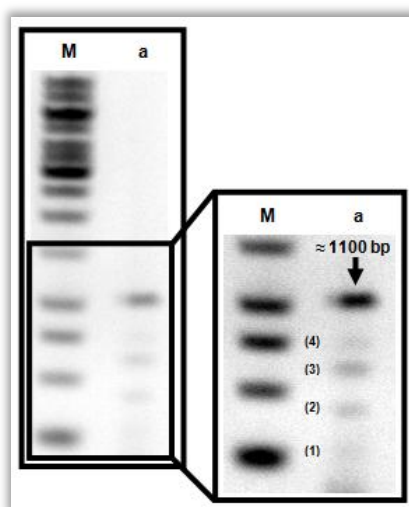
De seguida, efetuou-se a purificação do fragmento de ADN de interesse com o *kit* comercial *NZYGelpure* (*nzytech*), para que as impurezas que não se ligam à membrana de sílica-gel, que absorve seletivamente fragmentos de ADN até 10  $\mu$ g na presença de soluções tampão de ligação especializadas, sejam lavadas, de acordo com o descrito na secção II.2.1.4.2. dos Materiais e Métodos. De modo a confirmar que a purificação tinha sido executada com sucesso, efetuou-se novamente uma eletroforese em gel de agarose. Na Figura III.7. pode observar-se uma banda clara e distinta a aproximadamente 1100 bp correspondente ao fragmento de ADN de interesse, indicativo da sua correta purificação.



**Figura III.7.** Gel de agarose (0,8%) correspondente à purificação do fragmento de ADN codificante da proteína MreB (a); (M) Marcador de massas moleculares (*Fermentas*). Aplicaram-se 5  $\mu$ L de cada amostra às quais se adicionou 5  $\mu$ L de tampão de amostra. A eletroforese decorreu durante aproximadamente 20 minutos, a 100 V.

### III.1.2.2. Ligação do fragmento de ADN da MreB ao vetor de expressão pET-22b(+)

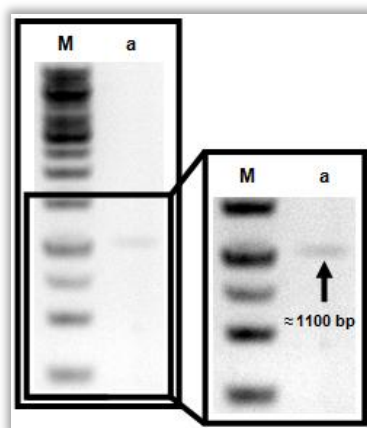
Para que fosse possível efetuar a reação de ligação do fragmento de ADN de interesse ao vetor de expressão pET-22b(+), hidrolisou-se tanto o fragmento de ADN como o vetor pET-22b(+) com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* (*Invitrogen*), durante 4 horas, a uma temperatura de 37 °C (ver secção II.2.1.4.1. dos Materiais e Métodos). Como é possível observar na Figura III.8., a reação de hidrólise do fragmento de ADN com as enzimas de restrição origina outros fragmentos de ADN de menores dimensões [ $\approx 250$  (1);  $\approx 400$  (2);  $\approx 600$  (3);  $\approx 750$  bp (4)], para além do fragmento correspondente à sequência codificante da proteína MreB. Este acontecimento pode ter ocorrido devido ao facto da enzima de restrição *EcoRI* poder exibir clivagem em locais não-específicos, conhecida como atividade “estrela” (“*star*” *activity*), dependendo das condições presentes na reação.



**Figura III.8.** Gel de agarose (0,8%) correspondente à amostra recolhida após a purificação do produto da reação de hidrólise do fragmento de ADN de interesse com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*. (M): 5  $\mu$ L marcador de massas moleculares (*Fermentas*); (a): 5  $\mu$ L de amostra composta por 20  $\mu$ L do fragmento de ADN de interesse, 5  $\mu$ L da Solução Tampão *REact@ 2*, 1  $\mu$ L da enzima *EcoRI* e 1  $\mu$ L da enzima *XhoI*, após purificação. Em todos os poços foram também adicionados 5  $\mu$ L de tampão de amostra. Os componentes utilizados na reação de hidrólise encontram-se descritos na secção II.2.1.4.1. dos Materiais e Métodos.

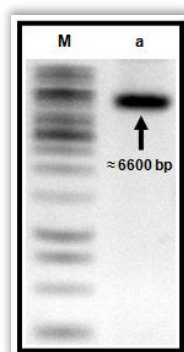
Muitas enzimas de restrição, como a *EcoRI*, perdem alguma especificidade para a sua sequência de reconhecimento sob determinadas condições<sup>112</sup>. A atividade “estrela” ocorre quando as enzimas de restrição hidrolisam sequências de reconhecimento que são semelhantes, mas não são idênticas à sua sequência de reconhecimento. Existem várias condições que contribuem para a “*star*” *activity*, nomeadamente, elevada concentração de glicerol (> 5% V/V), elevada proporção entre a concentração de enzima/ $\mu$ g de ADN (geralmente > 100 U de enzima/ $\mu$ g de ADN), baixa força iónica (< 25 mM de sal), pH elevado (> 8,0), tempo de reação (incubação) prolongado, presença de solventes orgânicos (DMSO, etanol) e substituição de  $Mg^{2+}$  por outros catiões divalentes ( $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ )<sup>93</sup>.

Deste modo, para que fosse possível a posterior reação de ligação do fragmento de ADN de interesse ao vetor de expressão pET-22b(+), purificou-se, a partir do gel apresentado na Figura III.8., a banda correspondente ao fragmento de ADN de interesse (aproximadamente 1100 bp), de acordo com o procedimento descrito na secção II.2.1.4.2.2. dos Materiais e Métodos, e o resultado obtido é mostrado na Figura III.9.



**Figura III.9.** Gel de agarose (0,8%) correspondente à amostra recolhida após a purificação da banda correspondente ao produto da purificação da reação de hidrólise do fragmento de ADN de interesse com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*. (M): 5  $\mu$ L do marcador de massas moleculares (*Fermentas*); (a): 5  $\mu$ L de amostra após purificação da banda do gel de agarose. Em todos os poços foram também adicionados 5  $\mu$ L de tampão de amostra. A eletroforese decorreu a 100 V durante aproximadamente 20 minutos.

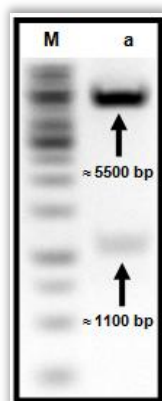
De seguida, realizou-se, então, a reação de ligação do fragmento correspondente à sequência de ADN que codifica para a proteína MreB, digerido e purificado, ao vetor pET-22b(+) digerido, purificado e desfosforilado, utilizando o *kit* comercial *Rapid DNA Ligation* (*Roche*) e a reação de ligação foi incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente, de acordo com o procedimento descrito na secção II.2.1.5. dos Materiais e Métodos. Posteriormente, realizou-se a reação de transformação das células competentes *NovaBlue GigaSingles*<sup>TM</sup> (*Novagen*) com o produto da reação de ligação, e o isolamento do ADN plasmídico utilizando o *kit* comercial *NZYMiniprep kit* (*nzytech*). Por fim, analisou-se o resultado em eletroforese de gel de agarose 0,8% (Figura III.10.), de acordo com os procedimentos descritos nas secções II.2.1.7.2., II.2.1.8. e II.2.1.3. dos Materiais e Métodos, respetivamente.



**Figura III.10.** Gel de agarose (0,8%) do (a) produto resultante da reação de ligação do fragmento de ADN da MreB ao vetor pET-22b(+), após digestão e purificação dos mesmos, e (M): Marcador de massas moleculares (*Fermentas*). Em ambos os casos, foram adicionados 5  $\mu$ L da amostra e 5  $\mu$ L do tampão de amostra. A eletroforese decorreu durante aproximadamente 20 minutos, a 100 V.

Através da análise do gel de agarose apresentado na Figura III.10., é possível confirmar que existe uma banda a aproximadamente 6600 bp, o que corresponderá ao fragmento de ADN de interesse (aproximadamente 1100 bp) inserido no vetor de expressão pET-22b(+), que possui aproximadamente 5500 bp.

Além disso, e para confirmar que o fragmento de ADN de interesse estava, de facto, inserido no vetor de expressão pET-22b(+), realizou-se uma reação de hidrólise com as mesmas enzimas de restrição utilizadas anteriormente, *EcoRI* e *XhoI* (1 hora e 30 minutos, 37 °C; *Fermentas*), e realizou-se nova eletroforese em gel de agarose. Através do resultado obtido é possível afirmar que o fragmento de ADN de interesse foi libertado do vetor de expressão, uma vez que aparece uma banda a aproximadamente 1100 bp, como se pode observar na Figura III.11. O vetor pET-22b(+) com o ADN que codifica para a proteína MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* ligado foi, então, designado por pMreB.



**Figura III.11.** Gel de agarose (1%) da reação de hidrólise do produto da ligação entre o vetor pET-22b(+) e o ADN codificante da proteína MreB com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* (1 hora e 30 minutos, 37 °C) (10  $\mu$ L de amostra (a)). (M): 5  $\mu$ L do marcador de massas moleculares (*Fermentas*). Em ambas as amostras foram também adicionados 5  $\mu$ L de tampão de amostra. Os componentes utilizados na reação de hidrólise encontram-se descritos na secção II.2.1.4.1. dos Materiais e Métodos. A eletroforese decorreu durante aproximadamente 20 minutos, a 100 V.



### III.1.2.3. Transformação de células *NovaBlue GigaSingles*<sup>TM</sup> (Novagen) com o vetor pMreB – sequenciação do ADN inserido no vetor

Para a sequenciação do plasmídeo pMreB recorreu-se aos serviços da *StabVida*. O resultado obtido para a sequência em nucleótidos da proteína MreB com o *T7 promoter primer* (MreB\_T7FWD; no sentido 5' – 3') e com o *T7 terminator primer* (MreB\_T7RVS; no sentido 3' – 5') está representado na Tabela III.I. Estes *primers* reconhecem a sequência complementar no vetor pET-22b(+), no qual está inserido o fragmento de ADN da MreB, a *T7 RNA polymerase* liga-se ao promotor T7 e transcreve o ADN clonado no vetor (Figura III.12.).



**Figura III.12.** Esquema ilustrativo da região de clonagem do vetor pET-22b(+), onde se encontra inserido o fragmento de ADN da MreB, com indicação do promotor T7 e dos *primers* *T7 promoter primer* e *T7 terminator primer*, a partir dos quais foi possível obter as sequências em nucleótidos MreB\_T7FWD e MreB\_T7RVS, respetivamente.

**Tabela III.I.** Sequências em nucleótidos do fragmento de ADN da proteína MreB, clonado no vetor pET-22b(+), obtidas pela *StabVida* utilizando os *primers* *T7 promoter primer* e *T7 terminator primer*, tendo sido atribuída a estas a designação de MreB\_T7FWD e MreB\_T7RVS, respetivamente, após a sequenciação do plasmídeo pMreB.

Designação	Sequências em nucleótidos do fragmento de ADN da MreB clonado
<b>MreB_T7FWD</b>	5' – ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGG CGATGGCCATGGATATCGGAATTAATTCGGATCCGAATTCAATGTTAATCAAAAGACTCCGAG GCTTATTCTCAAGCGACCTGTCCATCGACCTGGGCACCGCCAACACCCCTTATCTACGTGCGC GAACGCGGCATTGTACTTAACGAACCCCTCTGTCGTGGCCATCCGCACCAATAACTCCAGAA AATGGTCGCTGCCGTCCGGTCCGAAGCCAAACGCATGTTGGGCCGCACCCCGGGCAATATT ACCGCCATCCGTCCCATGAAAGATGGTGTGATCGCCGACTTCGTCGTGACCGAAAAATGCT CCAGCACTTTATTACAAAAGTGACGACGAAAACAGTTTCATTACCCCCGAGCCCCCGCGTACTCGT GTGTGTGCCCAGCAAATCTACCCAGGTAGAGCGCAAGGCCATCCGCGAATCGGCCCTGGGT GCAGGCGCCCGCGAGGTGTTCTGATCGAAGAACCCATGGCGGCCCGCCATTGGTGCCGGC CTGCCGCTGGAAGAAGCCAGCGCTCCATGATTGTCGACATCGGTGGCGGTACCACCGAGA TCGCGATTATCTCCCTGAATGGCATCGTCTATGCCGAATCCGTCCGGGTTGGTGCGACAAG TTCGACGAAGCCATCGTTACTTACGTCCGTCGCAACTACGGCAGCCTGATCGGCGATTCCAC AGCCGAGCGTATCAAGCATGAAATCGGCTGTGCCTATGAAGG – 3'
<b>MreB_T7RVS</b>	3' – ACCCTCCTGGGAGAACATTCCGATGCCACCGCGATCAATCACTTCCAGGGCTTTACCG CCGCCACGGGCTACGCAGGTCAGCGGATCTTCCGCAATAATGACCGGCAGGCCGGTCTCTT CGCTGATGAGCTTGTCAGGCCCCGAGCAGCGCACCGCCACCGGTCAGCAATGCCGC GCTCAGCAATGTCGGAGGCCAGTTCAGGCGGAGACTGCTCCAGGGCGCTCTTACGGTCTG GACGATCTGGGCCAGGGATTCTGAAGCGCGTCGAGAATTTCTTCGCTGTTACAGGTAAGG CCCGGGGCACACCTTCAGCCAGGTTGCGACCACGAACGTCGATTTCTCGCACTTCCAGGCC TTCATAGGCACAGCCGATTTGATGCTTGATACGCTCGGCTGTGGAATCGCCGATCAGGCTGC CGTAGTTGCGACGACGTAAGTAACGATGGCTTCGTCGAACTGTGCCACCAACCCGGAC GGATTCGGCATAGACGATGCCATTGAGGAGATAATCGCGATCTCGGTGGTACCGCCACCG ATGTGACAATCATGGAGCCGCTGGCTTCTTCCACCGGCAGGCCGGCACCAATGGCGGCCG CCATGG – 5'



Posteriormente, utilizou-se a ferramenta *Translate* (ExPASy) e traduziram-se as sequências em nucleótidos, designadas por MreB\_T7FWD e MreB\_T7RVS, para sequências em resíduos de aminoácidos, com a mesma designação, e alinharam-se separadamente com a sequência em resíduos de aminoácidos da proteína MreB da bactéria *M. hydrocarbonoclasticus* depositada na base de dados da *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (Figuras III.13. e III.14., respetivamente).

```

MreB_Marinobacter_hydrocarbono  -----MLIKRLRGLFSSDLSID 17
MreB_T7FWD_                      MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMDIGINSDPNSMLIKRLRGLFSSDLSID 50
                                   *****

MreB_Marinobacter_hydrocarbono  LGTANTLIYVRERGIVLNEPSVVAIRTNNSQKMAAVGSEAKRMLGRTPG 67
MreB_T7FWD_                      LGTANTLIYVRERGIVLNEPSVVAIRTNNSQKMAAVGSEAKRMLGRTPG 100
                                   *****

MreB_Marinobacter_hydrocarbono  NITAIRPMKDGVIADFVVTBKMLQHFHKVHENSFITSPRVLVCVPSKS 117
MreB_T7FWD_                      NITAIRPMKDGVIADFVVTBKMLQHFHKVHENSFITSPRVLVCVPSKS 150
                                   *****

MreB_Marinobacter_hydrocarbono  TQVERKAIRRESALGAGAREVFLIEPMAAAIGAGLPVEEASGSMIVDIGG 167
MreB_T7FWD_                      TQVERKAIRRESALGAGAREVFLIEPMAAAIGAGLPVEEASGSMIVDIGG 200
                                   *****

MreB_Marinobacter_hydrocarbono  GTTEIAIISLNGIVYAESVRVGGDKFDEAIVTYVRRNYGSLIGDSTAERI 217
MreB_T7FWD_                      GTTEIAIISLNGIVYAESVRVGGDKFDEAIVTYVRRNYGSLIGDSTAERI 250
                                   *****

MreB_Marinobacter_hydrocarbono  KHEIGCAYEGLEVRVIDVRGRNLAEGVPRAFTLNSEEILDALQESLAQIV 267
MreB_T7FWD_                      KHEIGCAYE----- 259
                                   *****

MreB_Marinobacter_hydrocarbono  QTVKSALEQSPPELASDIAERGIIVLTGGGALLRGLDKLISEETGLPVIIA 317
MreB_T7FWD_                      -----

MreB_Marinobacter_hydrocarbono  EDPLTCVARGGGKALEVIDRGGIGMFSQEG 347
MreB_T7FWD_                      -----

```

**Figura III.13.** Alinhamento das sequências em resíduos de aminoácidos da proteína MreB da bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* e da sequência MreB\_T7FWD, que corresponde à tradução para resíduos de aminoácidos da sequência em nucleótidos do fragmento de ADN da MreB clonado no vetor pET-22b(+), tendo sido utilizado pelos serviços da empresa *StabVida* o *primer T7 promoter primer*. O alinhamento destas sequências em resíduos de aminoácidos foi obtido através do programa informático *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e a sequência da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* foi obtida através da base de dados da *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Como se pode verificar, alinhando as sequências em resíduos de aminoácidos da proteína MreB de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* depositada na base de dados da *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* e da sequência MreB\_T7FWD adquirida após a tradução da sequência em nucleótidos fornecida pela empresa *StabVida*, utilizando o *primer T7 promoter primer* do vetor pET-22b(+) contendo o fragmento de ADN da MreB, toda a sequência, desde o resíduo de aminoácido 1 até ao 226 da sequência da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*, está correta. Porém, como a sequência do fragmento de ADN da MreB clonado no vetor pET-22b(+) tem aproximadamente 1100 bp, à medida que a sequência de

nucleótidos vai sendo sintetizada vai-se perdendo sensibilidade, pelo que foi necessário utilizar, também, o *primer T7 terminator primer*. Como se pode observar na Figura III.14., a partir do resíduo de aminoácido 144 até ao 347 da sequência da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*, toda a sequência clonada no vetor de expressão pET-22b(+) está, igualmente, correta.

```

MreB_Marinobacter_hydrocarbono      MLIKRLRGLFSSDLISIDLGNTANTLIYVRERGIVLNEPSVVAITNNSQKM 50
MreB_T7RVS_                          -----

MreB_Marinobacter_hydrocarbono      VAAVGSEAKRMLGRTPGNITAIRPMKDGVIADFVVTCKMLQHFHVKVHEN 100
MreB_T7RVS_                          -----

MreB_Marinobacter_hydrocarbono      SFITSPRVLVCVPSKSTQVERKAIREASALGAGAREVFLIEFPMAAAIGA 150
MreB_T7RVS_                          -----MAAAIGA 7
                                      *****

MreB_Marinobacter_hydrocarbono      GLPVEEASGSMIVDIGGGTTEIAIISLNGIVYAESVRVGGDKFDEAIVTY 200
MreB_T7RVS_                          GLPVEEASGSMIVDIGGGTTEIAIISLNGIVYAESVRVGGDKFDEAIVTY 57
                                      *****

MreB_Marinobacter_hydrocarbono      VRRNYGSLIGDSTAERIKHEIGCAYEGLEVREIDVRGNLAEGVPRAFTL 250
MreB_T7RVS_                          VRRNYGSLIGDSTAERIKHEIGCAYEGLEVREIDVRGNLAEGVPRAFTL 107
                                      *****

MreB_Marinobacter_hydrocarbono      NSEEILDALQESLAQIVQTVKSALEQSPPELASDIAERGIIVLTGGGALLR 300
MreB_T7RVS_                          NSEEILDALQESLAQIVQTVKSALEQSPPELASDIAERGIIVLTGGGALLR 157
                                      *****

MreB_Marinobacter_hydrocarbono      GLDKLISEETGLPVIIAEDPLTCVARGGGKALEVIDRGGIGMFSQEG 347
MreB_T7RVS_                          GLDKLISEETGLPVIIAEDPLTCVARGGGKALEVIDRGGIGMFSQEG 204
                                      *****

```

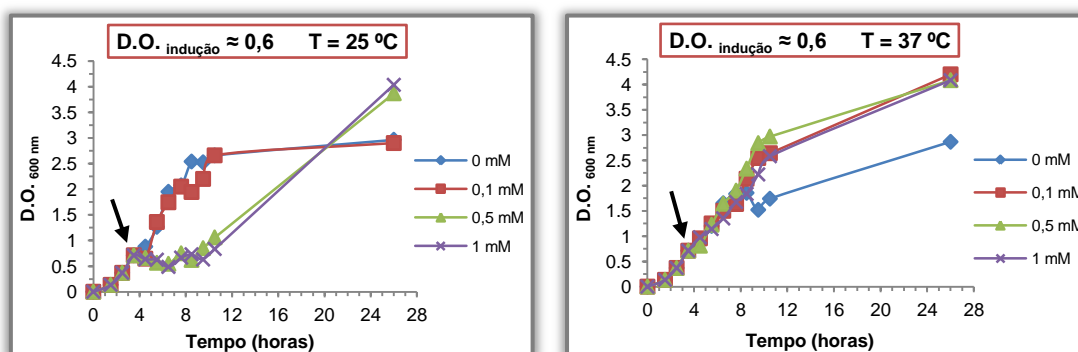
**Figura III.14.** Alinhamento das sequências em resíduos de aminoácidos da proteína MreB da bactéria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* e da sequência MreB\_T7RVS, que corresponde à tradução para resíduos de aminoácidos da sequência em nucleótidos do fragmento de ADN da MreB clonado no vetor pET-22b(+), tendo sido utilizado pelos serviços da *Stabvida* o *primer T7 promoter primer*. O alinhamento destas sequências em resíduos de aminoácidos foi obtido através do programa informático *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e a sequência da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* foi obtida através da base de dados da *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### III.1.3. Sobre-expressão e purificação da proteína MreB

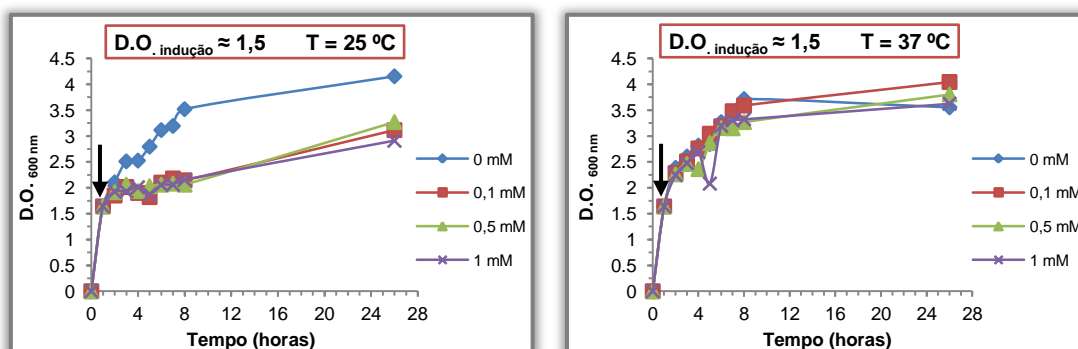
#### III.1.3.1. Testes de sobre-expressão da proteína MreB

Uma vez que, após análise da sequência de ADN que codifica para a proteína MreB obtida por clonagem, se verificou que a sequência obtida neste trabalho era idêntica à depositada na base de dados (*National Center for Biotechnology Information – NCBI*), realizou-se uma reação de transformação de células competentes *One Shot® BL21(DE3)* (Materiais e Métodos secção II.2.1.7.2.), sendo estas células adequadas para a transformação e expressão de proteínas. Para a expressão do gene *mreB* foi necessário o auxílio da *T7 RNA Polymerase*, fornecida pela estirpe *E. coli BL21(DE3)* que, quando se encontra em quantidade suficiente, se liga ao promotor T7 e transcreve o ADN clonado no vetor pET-22b(+), produzindo grandes quantidades de ARNm, sendo este, então, utilizado pela bactéria para produzir, também, grandes quantidades da proteína recombinante<sup>100</sup>.

Para tal, realizaram-se testes de expressão em diferentes condições, selecionando-se uma colônia transformante para o pré-inóculo em 50 mL de meio de cultura LB contendo 100 µg/mL ampicilina e incubou-se com agitação orbital, a 37 °C, 210 rpm, durante aproximadamente 16 horas. Posteriormente, inoculou-se 1 mL das células do pré-inóculo, células *One Shot® BL21(DE3)* contendo o plasmídeo pMreB, em 50 mL de LB, durante aproximadamente 2 horas, e monitorizou-se o crescimento através da leitura da densidade ótica a 600 nm ( $D.O_{600\text{ nm}}$ ) no espectrofotômetro (*Shimadzu UV-160A*). Quando a  $D.O_{600\text{ nm}} \approx 0,6$  ou 1,5, induziu-se cada uma delas com diferentes concentrações de IPTG (0; 0,1; 0,5; 1 mM) e incubou-se a 25 ou 37 °C, 190 rpm, monitorizando-se mais uma vez o crescimento através da leitura da  $D.O_{600\text{ nm}}$ , de hora a hora até às 7 horas e, por fim, 22 horas após indução com IPTG. Recolheram-se amostras a cada instante para que fosse possível representar graficamente o valor da  $D.O_{600\text{ nm}}$  obtido em função do tempo (em horas), antes e após indução com IPTG, para as condições testadas (Figuras III.15. e III.16.) e, também, analisar por eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), de modo a determinar quais as condições ótimas em que a proteína MreB é expressa.



**Figura III.15.** Gráfico da densidade ótica a 600 nm ( $D.O_{600\text{ nm}}$ ) em função do tempo (em horas) antes e após indução com IPTG, a 25 e 37 °C, respectivamente. As culturas celulares foram induzidas com 0; 0,1; 0,5; 1 mM IPTG (representado a azul, vermelho, verde e roxo, respectivamente) quando a  $D.O_{600\text{ nm}} \approx 0,6$  (assinalado com uma seta preta).



**Figura III.16.** Gráfico da densidade ótica a 600 nm ( $D.O_{600\text{ nm}}$ ) em função do tempo (em horas) antes e após indução IPTG, a 25 e 37 °C, respectivamente. As culturas celulares foram induzidas com 0; 0,1; 0,5; 1 mM IPTG (representado a azul, vermelho, verde e roxo, respectivamente) quando a  $D.O_{600\text{ nm}} \approx 1,5$  (assinalado com uma seta preta).

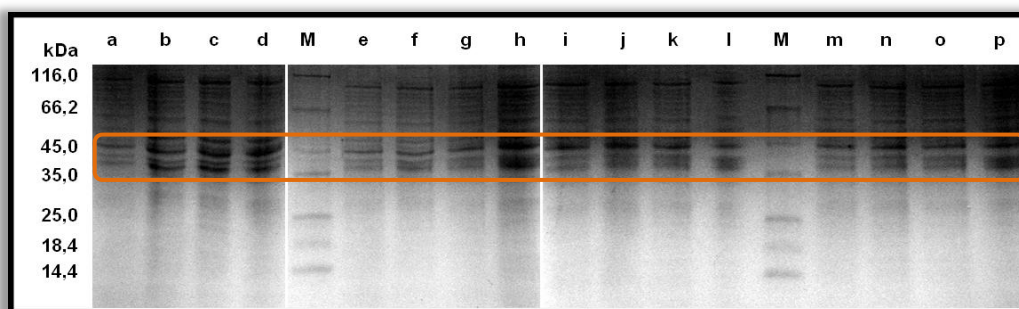
Em todos os caso, a taxa de crescimento é superior para uma temperatura de 37 °C, para as densidades óticas utilizadas para se iniciar a indução ( $D.O_{\text{indução}} \approx 0,6$  e 1,5) (Figuras III.15. e III.16.), à exceção da cultura celular à qual não foi adicionado IPTG, para a qual, à  $D.O_{\text{indução}} \approx 0,6$ , a taxa de crescimento a 37 °C foi menor do que a 25 °C. Em relação às diferentes concentrações de IPTG utilizadas para induzir as culturas, verificou-se, que, para quase todas as concentrações, a taxa de crescimento foi superior quando os crescimentos celulares eram realizados a 37 °C.

Para determinar qual o volume de amostra a aplicar no gel de SDS-PAGE, para que a intensidade da banda observada se encontre normalizada, o que permitirá determinar quais as condições óptimas de expressão da proteína MreB, utilizou-se a fórmula:

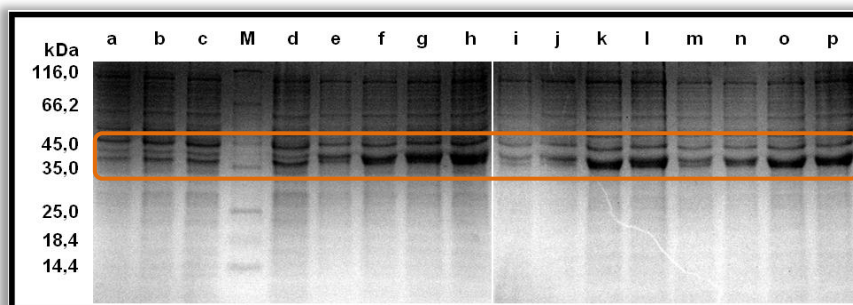
$$1,2 D.O_{\text{indução}} = 5 \mu\text{L},$$

sabendo que a  $D.O_{\text{indução}}$  corresponde ao valor da densidade ótica obtido a 600 nm, para cada amostra recolhida a cada instante. Na Figura III.17. (i) e (ii) são mostrados os géis para a  $D.O_{\text{indução}} \approx 0,6$ , a 25 e 37 °C, respetivamente.

(i)



(ii)



**Figura III.17.** Géis de SDS-PAGE (12,5% acrilamida) das amostras recolhidas em cada instante (3, 5, 7 e 18 horas, respetivamente) após indução com 0 mM (a-d), 0,1 mM (e-h), 0,5 mM (i-l) e 1 mM IPTG (m-p), a (i) 25 °C e (ii) 37 °C. (M) Marcador de massas moleculares. O retângulo laranja indica a zona entre as bandas do marcador correspondentes a 35 e 45 kDa, entre as quais se encontra a banda correspondente à proteína MreB. A eletroforese decorreu a 150 V, durante, aproximadamente, 1 hora.

Como se pode verificar através da análise dos gráficos das Figuras III.15. e III.16. e dos géis de SDS-PAGE (Figura III.17. (ii)), a expressão da proteína é maior a 37 °C, uma vez que a 25 °C, após a indução com praticamente todas as concentrações de IPTG testadas (exceto após a indução com 0,1 mM IPTG para a  $D.O_{600\text{ nm}} \approx 0,6$ ), os valores da  $D.O_{600\text{ nm}}$  obtidos para as amostras recolhidas até 7 horas após a indução com IPTG não variaram muito e as bandas correspondentes à proteína observadas no gel de SDS-PAGE da Figura III.17. (i) são pouco intensas, exceto quando a cultura não foi induzida com IPTG (poço c).

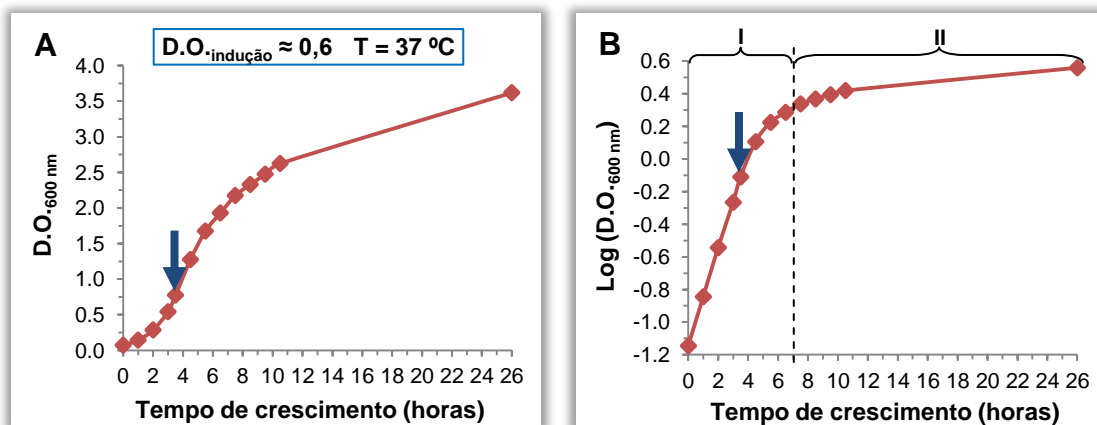
Analisando com maior detalhe o gel da Figura III.17. (ii), é possível observar que a diferença entre as amostras recolhidas 22 horas após a indução com 0,5 mM IPTG ou 1 mM de IPTG (poço h e poço p, respetivamente) é mínima, pelo que se concluiu que não seria necessário induzir com uma concentração superior a 0,5 mM IPTG.

A  $D.O_{\text{indução}} \approx 1,5$  não foi considerada como condição ótima de crescimento uma vez que seria necessário aguardar mais tempo (em horas) para que a cultura atingisse a  $D.O_{\text{indução}}$  desejada ou, então, utilizar um volume superior de células do pré-inóculo.

Deste modo, foi possível concluir que as condições ótimas de crescimento correspondem a uma  $D.O_{\text{indução}} \approx 0,6$ , sendo que a cultura deve ser induzida com 0,5 mM IPTG, a uma temperatura de 37 °C. As células serão, então, recolhidas por centrifugação 22 horas após a indução.

### **III.1.3.2. Purificação da proteína MreB**

Estabelecidas que estavam as condições ótimas de crescimento das bactérias *OneShot® BL21(DE3)* transformadas com o plasmídeo pMreB, realizou-se um crescimento em larga escala (6 L de meio de cultura LB). Para o crescimento de 6 L, primeiramente selecionou-se uma colónia transformante para o pré-inóculo em 150 mL de meio de cultura LB (*nzytech*), contendo 100 µg/mL ampicilina, e incubou-se a 37 °C, 210 rpm, com agitação orbital, durante 16 horas. Posteriormente, inoculou-se os 6 L de meio LB, contendo 100 µg/mL ampicilina, com a cultura bacteriana do pré-inóculo numa diluição 1:50, incubou-se até a  $D.O_{600\text{ nm}} \approx 0,6$ , a 37 °C, 210 rpm, altura em que se induziu com 0,5 mM IPTG, e voltou a incubar-se a 37 °C, 190 rpm, durante aproximadamente 22 horas. Recolheram-se amostras ao longo do tempo (hora a hora até 7 horas e, por fim, 22 horas após indução com IPTG) o que permitiu representar graficamente a  $D.O_{600\text{ nm}}$  em função do tempo (em horas) antes e após indução com IPTG (Figura III.18.).



**Figura III.18.** Curva de crescimento de bactérias *One Shot® BL21(DE3)* transformadas com o vetor pMreB. Representação gráfica da densidade ótica a 600 nm ( $D.O_{600\text{ nm}}$ ) (A) e do logaritmo da  $D.O_{600\text{ nm}}$  (B) em função do tempo de crescimento (em horas) antes e após indução (assinalada com uma seta azul escura) com 0,5 mM IPTG, a 37 °C. A tracejado está indicado o início da fase estacionária (fase II).

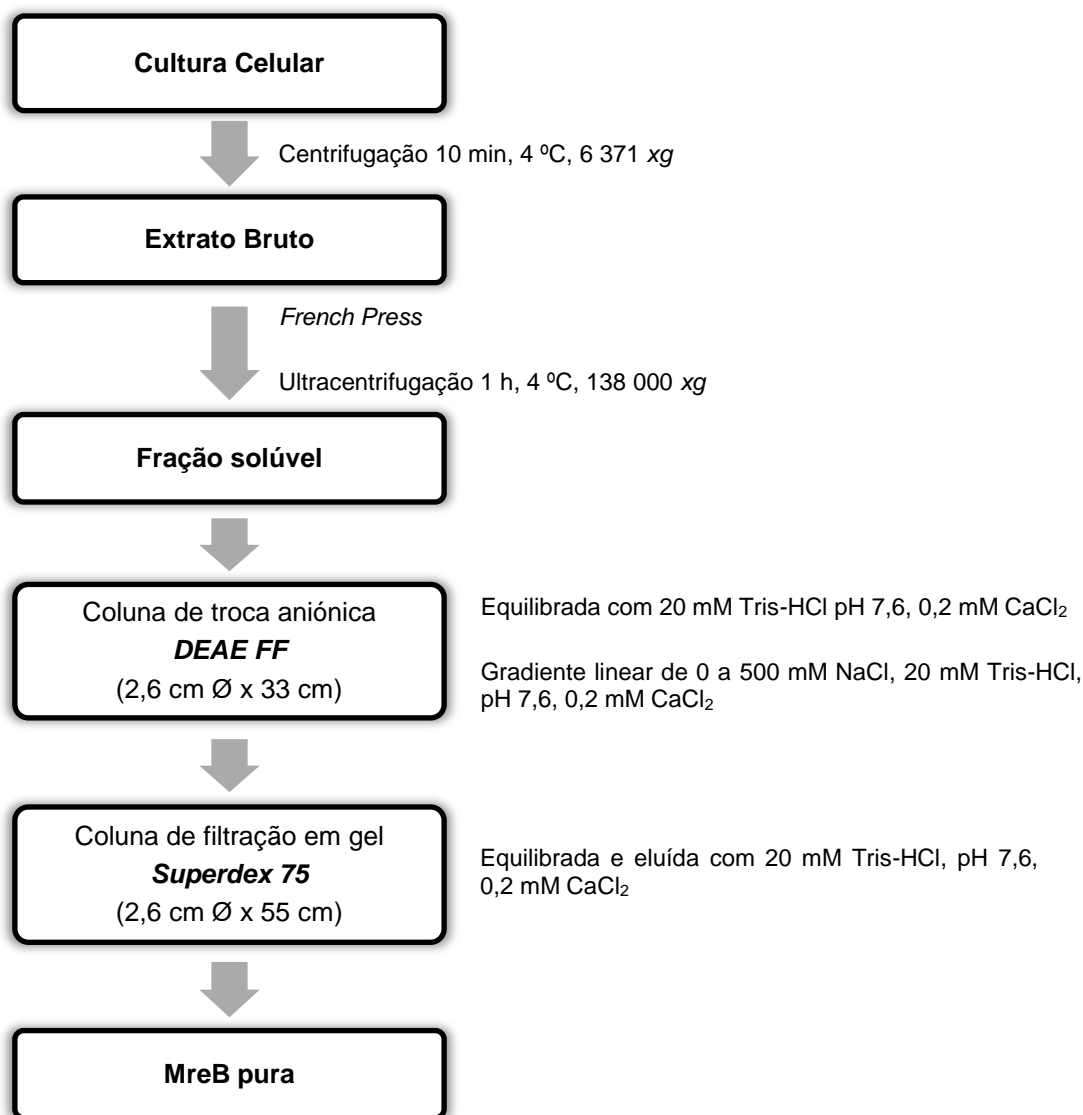
Através da análise da Figura III.18, é possível verificar que, para a curva de crescimento, com uma duração de aproximadamente 26 horas, das quatro fases características do crescimento bacteriano (fase *lag*, exponencial, estacionária e morte), apenas se observam duas – a fase exponencial (Figura III.18. B, fase I) e o início da fase estacionária (Figura III.18. B, fase II). Embora não exista uma fase estacionária muito evidente, verifica-se uma diminuição significativa da taxa de crescimento a partir das 3 horas após a indução com IPTG. Esta fase é mais evidente na Figura III.18. B, onde se pode observar a fase exponencial (fase I) e o início da fase estacionária (fase II).

A fase de adaptação ou *lag* não foi observada, indicando que a adaptação às novas condições de crescimento foi imediata. De facto, a duração desta fase depende diretamente das condições de crescimento anteriores, sendo que a composição do meio de cultura do crescimento é idêntica à do pré-inóculo.

A fase de morte, mesmo após 26 horas de cultivo, não foi atingida. Como tal, para se saber a que tempo de crescimento (em horas) esta fase seria atingida, seria necessário monitorizar o crescimento bacteriano durante mais tempo.

A massa celular foi, então, recolhida por centrifugação (centrífuga *BECKMAN COULTER™, Avanti® J-26 XPI*, rotor JA-10), as células foram ressuspensas em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ , numa proporção de aproximadamente 0,5 gramas de células/mL de solução tampão, e armazenadas a -80 °C durante aproximadamente 30 minutos, enquanto o sobrenadante foi descartado. De seguida, a massa celular obtida anteriormente foi descongelada e efetuou-se a lise celular com o auxílio da *French Press (Thermo scientific)*, a 12500 *psi*. A amostra obtida foi então ultracentrifugada (ultracentrífuga *BECKMAN COULTER™ Optima 80LX*; rotor 45 Ti), a 138 000 *xg*, durante 1 hora e 10 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante, fração solúvel ou citoplasmática, para onde é expressa a proteína MreB, foi,

posteriormente, utilizado para a purificação desta última, em duas etapas cromatográficas, como está esquematizado na Figura III.19.



**Figura III.19.** Esquema ilustrativo do processo de purificação da MreB a partir de uma cultura celular de 6 L até à proteína pura.

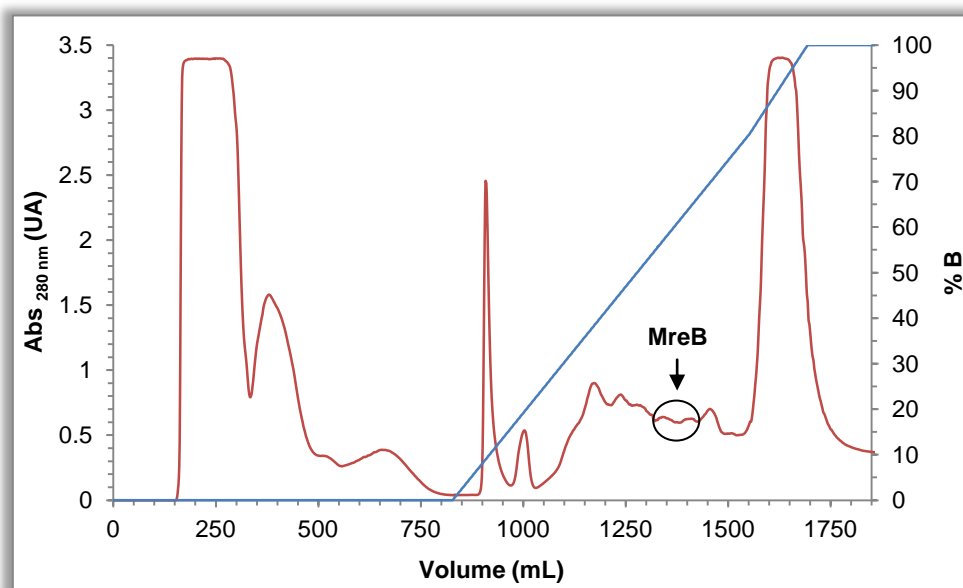
A eluição das amostras proteicas nas colunas *DEAE FF* e *Superdex 75* foi monitorizada ao comprimento de onda de 280 nm, ao qual absorvem todas as proteínas<sup>113,114</sup>.

A primeira etapa da purificação consistiu numa cromatografia de permuta aniônica, tendo-se utilizado como matriz a resina *DEAE Fast Flow* (Figura III.20.). Esta cromatografia baseia-se na separação das proteínas segundo a sua carga. Sabendo que esta resina é aniônica (com carga positiva), tem afinidade para os aniões e, portanto, as proteínas são eluídas por ordem decrescente do seu ponto isoelétrico (pI). Por outras palavras, é de esperar que as proteínas com pI mais elevado sejam as primeiras a ser eluídas<sup>113</sup>. O ponto isoelétrico da MreB, estimado com base na sequência de aminoácidos utilizando a ferramenta *ProtParam*



(ExPASy), é de 5,22. Os grupos carregados positivamente das cadeias laterais dos aminoácidos aspartato e glutamato conferem à proteína uma carga negativa a pH 7,6, o que vai possibilitar a interação da proteína com a matriz da coluna carregada positivamente.

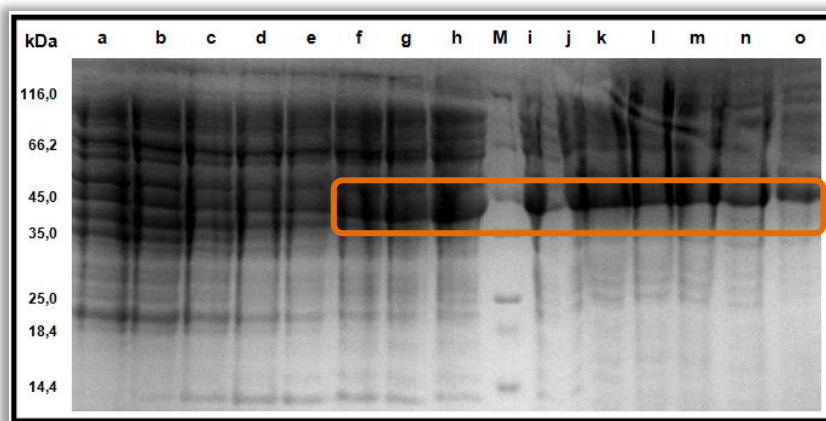
De modo a eluir as proteínas que ficaram adsorvidas, entre as quais se encontra a MreB, aumentou-se a força iônica do tampão de eluição (20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ ), com aplicação de um gradiente linear de 0 – 500 mM NaCl em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ , a um fluxo de 4 mL/min (linha azul da Figura III.20.).



**Figura III.20.** Cromatograma da primeira etapa da purificação, cromatografia de permuta aniônica (matriz DEAE FF) do extrato citoplasmático proveniente de um crescimento de 6 L de células BL21 transformadas com o plasmídeo pMreB. A vermelho está representada a  $\text{Abs}_{280 \text{ nm}}$  (eixo vertical principal), a azul o gradiente salino entre 0 – 500 mM NaCl em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$  (eixo vertical secundário), ambos representados em função do volume (em mL) de 20 mM Tris-HCl pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ . A MreB começou a ser eluída a, aproximadamente, 275 mM de NaCl (55% da concentração máxima de NaCl).

A identificação das proteínas eluídas nas frações recolhidas foi efetuada através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) (Figura III.21.), permitindo identificar que a MreB foi eluída nas frações correspondentes ao volume de eluição entre 1320 e 1440 mL (assinalado com um círculo preto na Figura III.20.), com aproximadamente 55% da concentração máxima de NaCl (275 mM NaCl).

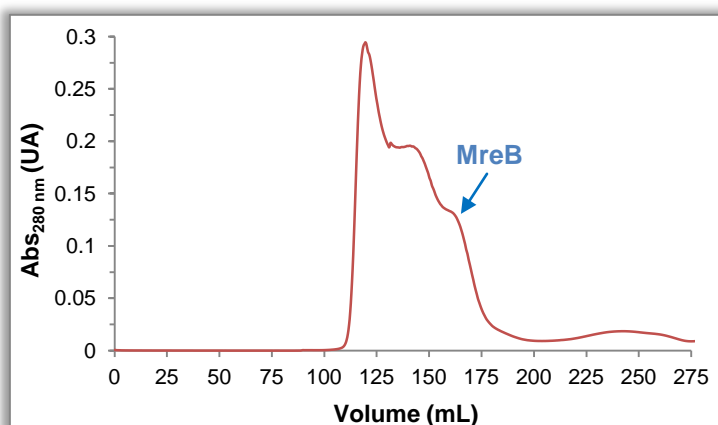




**Figura III.21.** Gel de SDS-PAGE (12,5% acrilamida) das frações (a-o) recolhidas após cromatografia de troca aniônica (coluna *DEAE FF*); (M) marcador de massas moleculares (*Thermo scientific*). No retângulo laranja estão identificadas as frações com maior expressão da proteína MreB. A eletroforese foi realizada a 150 V durante aproximadamente 1 hora.

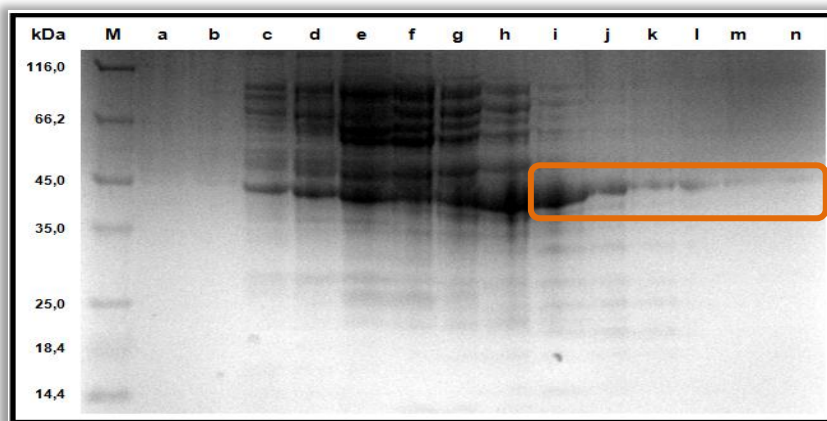
Após a análise do gel de SDS-PAGE da Figura III.21, foi possível constatar quais eram as frações que continham a proteína MreB expressa em maior quantidade e com menos contaminantes (f-o); reuniram-se essas frações e concentraram-se através de uma membrana 30 000 MWCO (*Vivacell 70*; *Sartorius*), a uma pressão de 3 bar, a 4 °C.

O segundo e último passo da purificação consistiu numa cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel, tendo-se utilizado uma matriz *Superdex 75*, que separa as proteínas de acordo com a sua massa molecular. A fração concentrada obtida após a primeira coluna cromatográfica (*DEAE FF*) foi aplicada nesta última coluna utilizada do processo de purificação e eluída com o tampão 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$  a um fluxo de 2 mL/min (Figura III.22.)



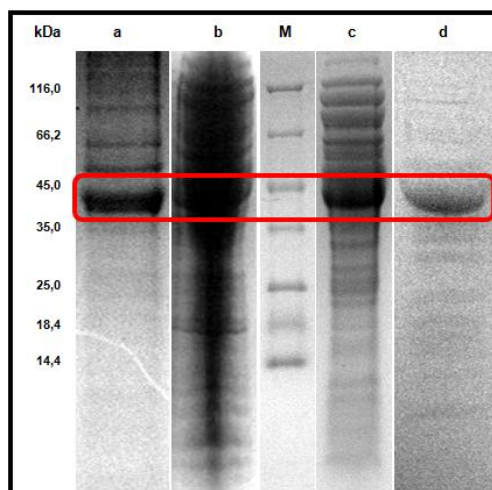
**Figura III.22.** Cromatograma da última etapa da purificação, cromatografia de filtração em gel (matriz *Superdex 75*), da fração da MreB concentrada obtida após a etapa anterior. A amostra foi eluída em 20 mM Tris-HCl pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$  e a absorbância foi monitorizada a 280 nm (representado a vermelho). A azul está indicado o pico máximo de absorbância correspondente à MreB com menos contaminantes presentes em solução.

Mais uma vez, a identificação das proteínas eluídas nas frações recolhidas foi efetuada por SDS-PAGE (Figura III.23.), permitindo identificar as frações onde a MreB foi eluída com menos contaminantes presentes em solução, correspondentes ao volume de eluição entre 154 e 175 mL (o pico máximo de absorvância das frações contendo a MreB com menos contaminantes está assinalado com uma seta na Figura III.22.).



**Figura III.23.** Gel de SDS-PAGE (12,5% acrilamida) das frações (a-n) recolhidas após cromatografia de filtração em gel (coluna *Superdex 75*); (M) marcador de massas moleculares (*Thermo scientific*). No retângulo laranja estão identificadas as frações que continham a MreB praticamente pura. A eletroforese foi realizada a 150 V durante aproximadamente 1 hora.

Na Figura III.24. está representado um gel de SDS-PAGE de todas as frações recolhidas no processo de purificação da proteína MreB, desde a cultura celular de 6 L induzida com 0,5 mM IPTG, a 37 °C, 190 rpm (poço a), até à fração da proteína MreB pura (poço d), depois de reunidas e concentradas as frações recolhidas após a coluna *Superdex 75* contendo a MreB praticamente pura, ou seja, com menos contaminantes presentes em solução, através de uma membrana 30 000 MWCO (*Vivacell 70*; *Sartorius*), a uma pressão de 3 bar, a 4 °C.



**Figura III.24.** Gel de SDS-PAGE (12,5% acrilamida) de todo o processo de purificação da proteína MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* desde a cultura celular de 6 L até à MreB pura. (a) Fração recolhida após o crescimento da cultura celular; (b) fração solúvel recolhida após ultracentrifugação; (M) marcador de massas moleculares; (c) fração concentrada recolhida após coluna *DEAE FF*; (d) fração concentrada recolhida após coluna *Superdex 75*. No retângulo vermelho está identificada a banda correspondente à MreB em todos os passos realizados. A eletroforese foi realizada a 150 V durante aproximadamente 1 hora.

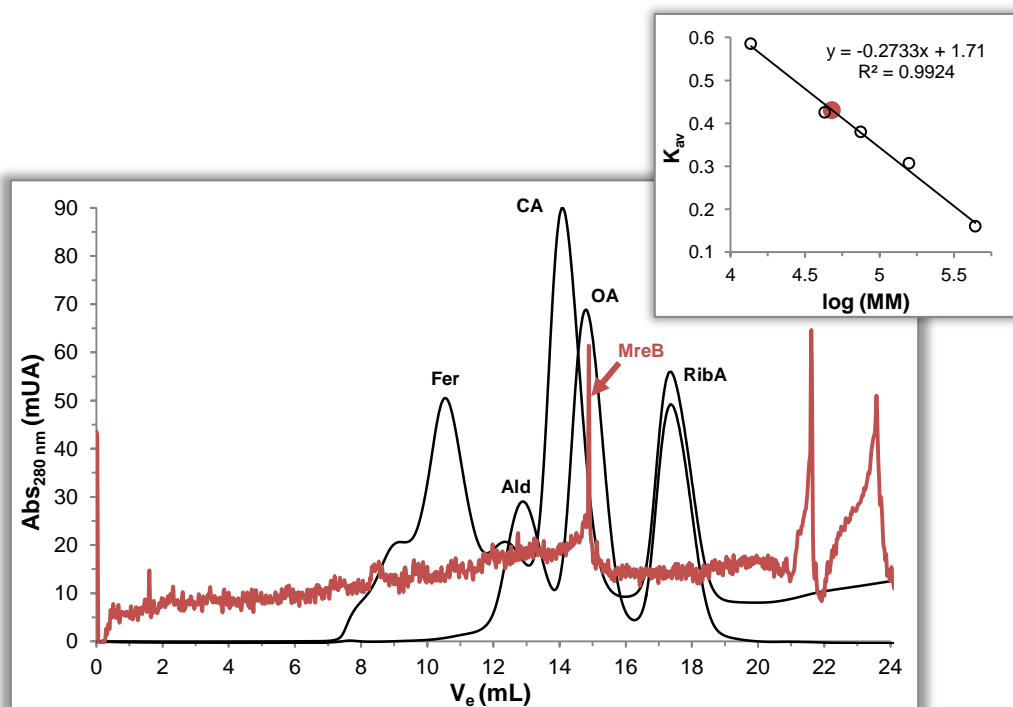
A análise do gel de SDS-PAGE da Figura III.24. revela que a coluna de troca aniônica utilizada na primeira etapa de purificação (poço c) foi eficaz na remoção de alguns contaminantes, enquanto a coluna de filtração em gel, utilizada na última etapa (poço d) foi extremamente eficaz no processo de purificação, pois a proteína encontra-se significativamente mais pura, podendo ser usada nos estudos de caracterização subsequentes.

## III.2. Caracterização bioquímica da proteína MreB

### III.2.1. Determinação da massa molecular da MreB

#### III.2.1.1. Determinação por filtração em gel

De modo a determinar a massa molecular da proteína MreB, em solução, após purificação, realizou-se uma cromatografia de filtração em gel, utilizando uma coluna *Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare)* equilibrada com 50 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 150 mM NaCl, a um fluxo de 0,5 mL/min. A reta de calibração foi efetuada com várias proteínas de massas moleculares conhecidas [proteínas padrão: Ribonuclease A (13 700 Da), Ovalbumina (43 000 Da), Conalbumina (75 000 Da), Aldolase (158 000 Da) e Ferritina (440 000 Da)], como descrito nos Materiais e Métodos, secção II.2.4.2.1. A Figura III.25. ilustra o cromatograma obtido aquando da eluição das proteínas padrão e da MreB, a preto e vermelho, respetivamente.



**Figura III.25.** Cromatograma obtido para curva de calibração da cromatografia de exclusão molecular (*Superdex 200 10/300 GL*). No cromatograma estão representadas as absorvâncias ao comprimento de onda de 280 nm das proteínas padrão (preto) e da MreB (vermelho), ambas em função do volume de eluição ( $V_e$ , em mL), onde Fer – Ferritina, Ald – Aldolase, CA – Conalbumina, OA – Ovalbumina e RibA – Ribonuclease A. No canto superior direito está representada a reta de calibração do coeficiente de distribuição ( $K_{av}$ ) ( $V_0 = 7,98$  mL e  $V_t = 24$  mL), em função do logaritmo das massas moleculares ( $\log(MM)$ ). Os círculos pretos sem preenchimento representam os padrões e o círculo vermelho com preenchimento a MreB.

A massa molecular da MreB foi determinada através da representação do coeficiente de distribuição ( $K_{av}$ ) em função dos valores do logaritmo das massas moleculares das proteínas padrão ( $\log(MM)$ ), como explicado na secção II.2.4.2.1. dos Materiais e Métodos. Através da equação da reta de calibração,  $K_{av} = -0,2733 (\log(MM)) + 1,71$ , pode determinar-se a massa molecular aparente da MreB; sabendo que o  $K_{av} = 0,4307$ , o valor obtido foi de  $48 \pm 10$  kDa (Tabela III.II.).

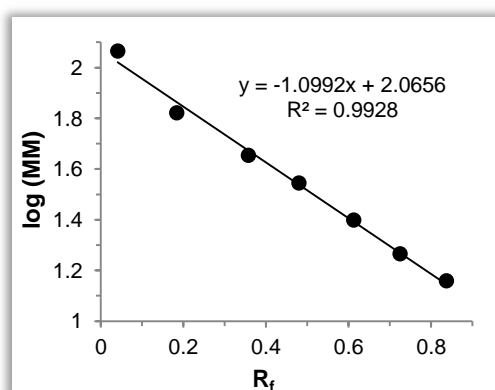
**Tabela III.II.** Valores utilizados na determinação da massa molecular aparente da MreB. Sendo que  $V_t = 24$  mL,  $V_0 = 7,98$  mL e que a equação da reta corresponde a  $K_{av} = -0,2733 (\log(MM)) + 1,71$ .

Proteínas	$V_e$ (mL)	$K_{av}$	$\log(MM)$	Massa Molecular (Da)
Ribonuclease	17,36	0,5855	4,1367	13 700
Ovalbumina	14,80	0,4257	4,6335	43 000
Conalbumina	14,07	0,3801	4,8751	75 000
Aldolase	12,90	0,3071	5,1987	158 000
Ferritina	10,55	0,1604	5,6435	440 000
<b>MreB</b>	<b>14,88</b>	<b>0,4307</b>	<b>4,6809</b>	<b>47 962</b>

Tendo em conta que a massa molecular teórica da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*, calculada a partir da sequência de aminoácidos utilizando a ferramenta *ProtParam* (ExPASy), é de 37 014,5 Da (37 kDa), é possível prever que a proteína purificada apresenta uma massa molecular idêntica à teórica, tendo em conta os erros inerentes a esta determinação.

### III.2.1.2. Determinação por gel de SDS-PAGE

Para determinar a massa molecular da MreB por SDS-PAGE, aplicou-se no mesmo gel um conjunto de sete proteínas padrão de massas molecular conhecida [ $\beta$ -galactosidase (116 kDa), Albumina de soro bovino (66,2 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Lactato Desidrogenase (35 kDa), REase Bsp981 (25 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa) e Lisozima (14,4 kDa); *Thermo Scientific*] e a amostra da proteína MreB (amostras M e d da Figura III.24., respetivamente). De seguida, representou-se graficamente o logaritmo de massas moleculares ( $\log (MM)$ ) em função da distância de migração relativa ( $R_f$ ) com base nos valores obtidos para as bandas das massas moleculares padrão. A massa molecular da proteína MreB foi, então, calculada por interpolação, usando a equação da reta de calibração  $\log (MM) = -1,0992 \times (R_f) + 2,0656$ , representada na Figura III.26., tendo-se obtido o valor 42,478 kDa.



**Figura III.26.** Reta de calibração do logaritmo das massas moleculares ( $\log (MM)$ ) das proteínas padrão em função da distância de migração relativa no gel ( $R_f$ ).

Na Tabela III.III. são comparados os dois métodos utilizados para determinar a massa molecular da proteína MreB, a cromatografia de filtração em gel e o gel de SDS-PAGE. Como é possível observar na Tabela III.III., a diferença existente entre os valores de massa molecular da MreB obtida através dos dois métodos utilizados não é significativa.

**Tabela III.III.** Comparação entre os dois métodos de determinação da massa molecular da MreB utilizados (determinação por filtração em gel e por gel de SDS-PAGE).

Massa Molecular da MreB (kDa)	
Filtração em gel	Gel de SDS-PAGE
$48 \pm 10$	$42,478 \pm 0,030$

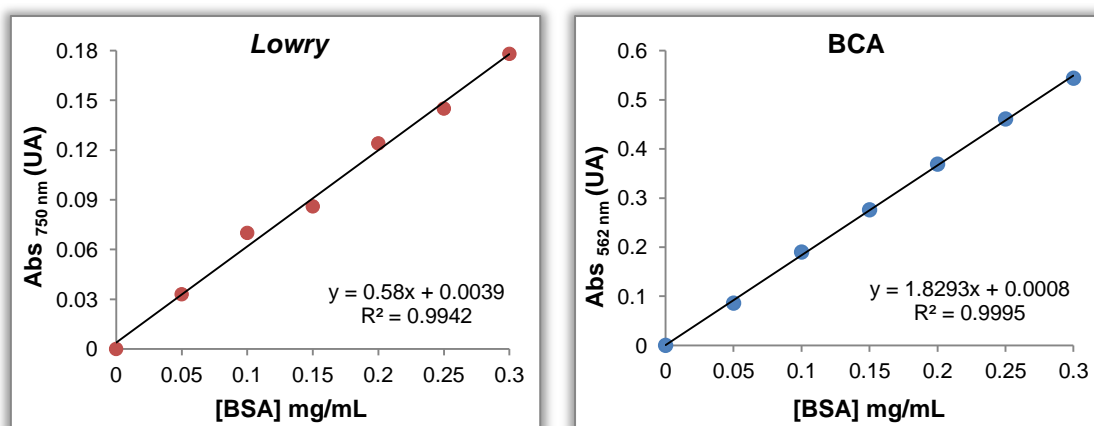
O gel de SDS-PAGE obtido para a MreB pura (Figura III.24., amostra d) mostrou a presença de uma banda com mobilidade correspondente a uma massa molecular de aproximadamente 43 kDa. Por outro lado, a massa molecular da MreB determinada através da cromatografia de filtração em gel foi de 48 kDa. Embora estes valores sejam ligeiramente mais elevados do que o valor calculado a partir da sequência em resíduos de aminoácidos utilizando a ferramenta *ProtParam* (*ExpPASy*) (37 kDa), tendo em conta os erros inerentes a cada método de determinação, pode afirmar-se que estão dentro do intervalo de erro.

É de salientar que as discrepâncias observadas entre os valores de massa molecular teóricos (calculados a partir da sequência de aminoácidos utilizando a ferramenta *ProtParam*, *ExpPASy*) obtidos para a MreB de outras bactérias (*T. maritima* e *E. coli*) e a massa molecular referida em estudos anteriores<sup>54,58</sup> não se observaram. Por exemplo, a massa molecular da *TmMreB* calculada a partir da sequência em resíduos de aminoácidos utilizando a ferramenta *ProtParam* (*ExpPASy*) foi de 36,2 kDa, sendo que nos ensaios de polimerização de van den Ent *et al.* (2010) apresentava uma massa molecular de 35,8 kDa. A *TmMreB* apresenta uma massa molecular inferior à calculada para a MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*, uma vez que a *TmMreB* possui menos resíduos de aminoácidos do que a MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*, como se pode observar no alinhamento de sequências da Figura III.2. A *EcMreB* é a proteína que apresenta maior percentagem de identidade com a MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*, como já foi referido anteriormente, possuindo o mesmo número de resíduos de aminoácidos e uma massa molecular estimada a partir da sequência em resíduos de aminoácidos, utilizando a mesma ferramenta (*ProtParam*; *ExpPASy*), de 37 kDa. Porém, Kruse *et al.* (2006) referem no seu estudo que a massa molecular da *EcMreB* é de 36,8 kDa, que é ligeiramente menor do que a estimada (37 kDa). No entanto, as técnicas utilizadas nos estudos acima mencionados para a determinação da massa molecular da MreB (espetrometria de massa e cromatografia de exclusão molecular acoplada a detetores de dispersão de luz multiangular, respetivamente<sup>54,58</sup>), são mais precisas do que as utilizadas no presente trabalho (filtração em gel e gel de SDS-PAGE), o que pode explicar a maior diferença entre as massas moleculares prevista e prática da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* obtidas no presente trabalho, uma vez que se usaram métodos de determinação menos precisos que os acima descritos por outros autores.

### **III.2.2. Quantificação de proteína**

A quantificação de proteína foi realizada segundo o método de *Lowry* ou através do *kit* comercial do BCA, como referido nos Materiais e Métodos (secção II.2.3.3.).

Por interpolação a partir das equações das retas de calibração (Figura III.27.), usando amostras de BSA com concentração rigorosamente conhecida ( $Abs_{750nm} = 0,58 [MreB] + 0,0039$  e  $Abs_{562nm} = 1,8293 [MreB] + 0,0007$ , obtidas pelo método de *Lowry* ou do BCA, respetivamente), e tendo em conta o fator de diluição dos ensaios realizados, foi possível determinar a concentração da proteína total na amostra obtida (Tabela III.IV.).



**Figura III.27.** Retas de calibração obtidas pelo método de *Lowry* e pelo método de *BCA*, utilizando amostras de BSA de concentração conhecida.

**Tabela III.IV.** Concentração da proteína total na amostra de através do método de *Lowry* e do método de *BCA*.

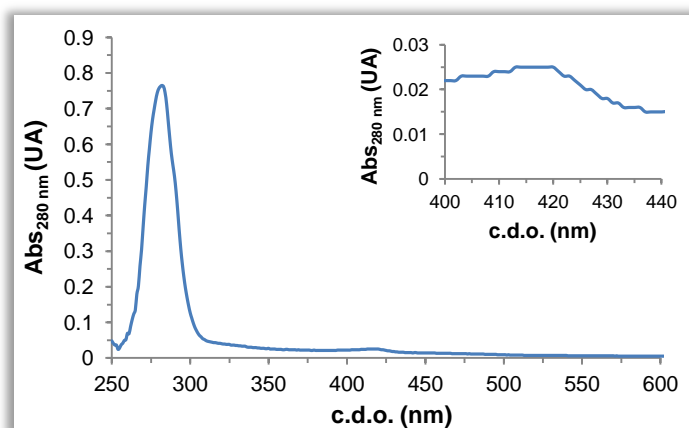
Método de <i>Lowry</i>		Método de <i>BCA</i>	
[MreB] (mg/mL)	[MreB] (μM)	[MreB] (mg/mL)	[MreB] (μM)
1,108	28 ± 3	0,943	24 ± 2

Para o método de *Lowry*, Chou & Goldstein (1960)<sup>115</sup> e Legler *et al.* (1985)<sup>116</sup> sugerem que a redução do cobre ocorre diretamente através das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina) e, sabendo o número de resíduos destes aminoácidos presentes na MreB, calculados a partir da sua sequência primária através da ferramenta informática *ProtParam (ExPASy)*, é possível afirmar que, como a proteína não possui triptofanos, mas possui 5 tirosinas, 3 cisteínas, 10 asparaginas e 4 histidinas, é, de facto, espectável que a concentração de proteína total determinada por este método seja superior à concentração determinada pelo método de *BCA*, uma vez que, através deste último, apenas a tirosina, triptofano, cisteína e cistina são capazes de reduzir o cobre e, como tal, a concentração determinada será, no caso particular da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*, inferior.

No entanto, como o *BCA* é um reagente mais estável em condições alcalinas, pode ser incluído na solução de cobre para permitir um procedimento de uma única etapa, tornando a técnica mais rápida do que o método de *Lowry*, sendo esta a grande vantagem da sua utilização.

### III.2.3. Espetroscopia de absorção na região do Ultravioleta-Visível – determinação do coeficiente de extinção molar

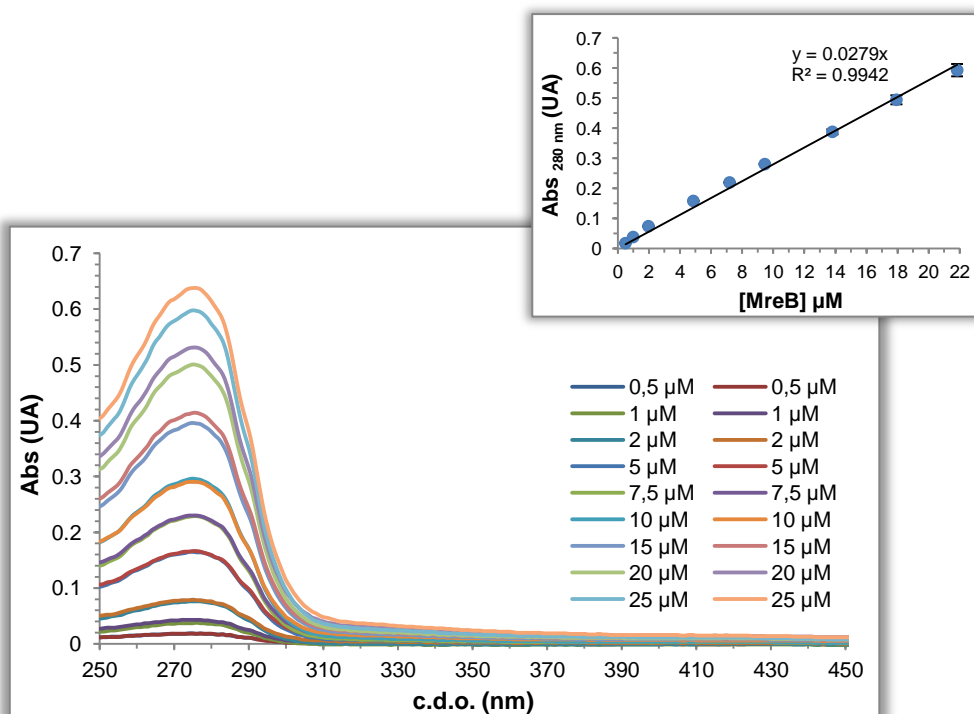
A MreB purificada foi, também, analisada por espectroscopia de absorção na região do UltraVioleta-Visível (UV-Vis). Os espectros foram obtidos entre os comprimentos de onda de 250 e 900 nm, num espectrofotômetro UV-1800 (*Shimadzu Spectrophotometer*), para diferentes concentrações de proteína (em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,2 mM CaCl<sub>2</sub> e 0,2 mM ATP). Na Figura III.28. apresenta-se, a título de exemplo, o espectro obtido para 556 µM MreB, sendo que no *inset* desta se encontra destacado o pico correspondente ao ATP, uma vez que a MreB possui um local de ligação de nucleótidos.



**Figura III.28.** Espectro de UV-Vis de 556 µM MreB em 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,2 mM CaCl<sub>2</sub> e 0,2 mM ATP, com destaque do pico correspondente ao ATP (*inset*).

Através da representação gráfica dos valores de absorvância ao comprimento de onda de 280 nm em função da concentração de MreB (em µM), e sabendo que  $Abs = \epsilon \times c \times b$  (lei de *Lambert-Beer*), foi possível determinar o coeficiente de extinção molar da proteína MreB, sendo este de 27 900 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Figura III.29.).





**Figura III.29.** Determinação do coeficiente de extinção molar da proteína MreB em tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,2 mM CaCl<sub>2</sub> e 0,2 mM ATP. No canto superior direito está representada a reta de calibração das absorvâncias obtidas a 280 nm em função das diferentes concentrações de MreB.

O coeficiente de extinção molar obtido experimentalmente é superior ao valor teórico estimado a partir da sequência em resíduos de aminoácidos utilizando a ferramenta *ProtParam* (ExPASy),  $7\,575\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , provavelmente devido à presença de alguns contaminantes presentes, ainda, em solução.

### III.3. Caracterização estrutural da proteína MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*

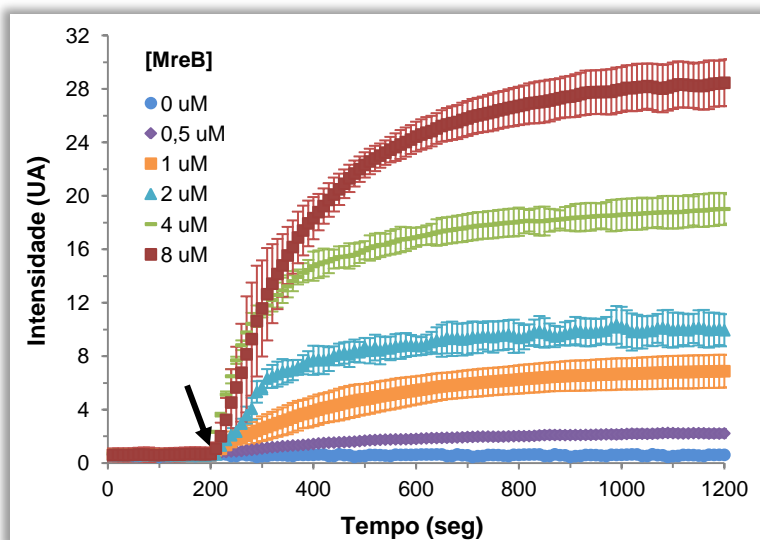
#### III.3.1. A polimerização de MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*

A actina presente em eucariotas tem como uma das suas principais características a capacidade de formar filamentos, o que está intimamente ligado às funções biológicas que desempenha<sup>1,2</sup>. Tal como referido na Introdução (secção I.1.1.), a MreB isolada de outras bactérias apresenta, também, esta capacidade, o que tem permitido, entre outros, a sua classificação como proteínas homólogas, pertencentes à mesma superfamília<sup>9,11,21</sup>.

No entanto, a MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* não havia sido, ainda, estruturalmente caracterizada, pelo que no presente trabalho, após a sua caracterização bioquímica, se torna

essencial determinar se, à semelhança de outras MreB de origem procariota, também esta apresenta a capacidade para polimerizar, tendo-se, para tal, recorrido à técnica de dispersão de luz, de acordo com o descrito na secção II.3.1. dos Materiais e Métodos.

Como se pode observar pelo gráfico presente na Figura III.30., uma concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  de MreB conduz já a um aumento da intensidade de fluorescência, indicativo da formação de filamentos.



**Figura III.30.** Dependência da concentração da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*. Intensidade da dispersão de luz em função do tempo (em segundos) de polimerização da MreB, em condições padrão (20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ ), para diferentes concentrações de MreB. A polimerização foi iniciada pela adição de 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM ATP e 50 mM KCl, 200 segundos após o início dos ensaios (assinalado com uma seta preta). Os ensaios de dispersão de luz foram monitorizados a  $90^\circ$  em relação à luz incidente, num espectralfluorímetro com ambos os monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção II.2.4.3. dos Materiais e Métodos.

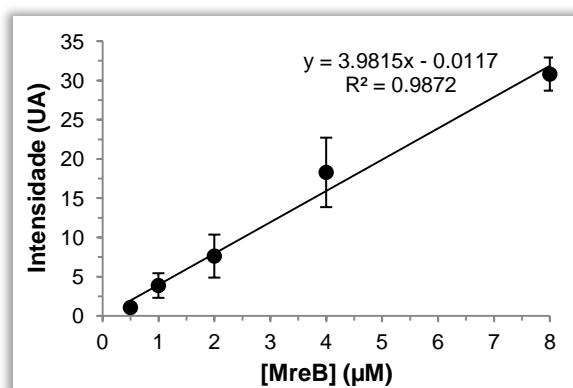
Além disso, e de modo a determinar qual o efeito da concentração da MreB na extensão da polimerização, testaram-se várias concentrações de MreB e verificou-se que a intensidade do estado estacionário (patamar) depende linearmente da concentração da MreB (Figuras III.30. e III.31.).

A concentração crítica foi determinada por extrapolação da equação da reta obtida,  $\text{Intensidade} = 3,9815 [\text{MreB}] - 0,0117$ , para o valor de intensidade igual a zero. Um ajuste linear da intensidade dependente da concentração indicou uma concentração crítica de, aproximadamente, 3 nM. Uma concentração crítica idêntica foi obtida para a *TmMreB*, num estudo realizado anteriormente<sup>20</sup>. Uma análise semelhante para a actina sugeriu uma concentração crítica de aproximadamente, 0,25  $\mu\text{M}$ <sup>117</sup>, ou seja, a concentração crítica da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* é, aproximadamente, 100 vezes menor que a da actina.

No entanto, o valor da concentração crítica da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*, determinado no presente trabalho e da *TmMreB*, determinado por Esue *et al.* (2005), é

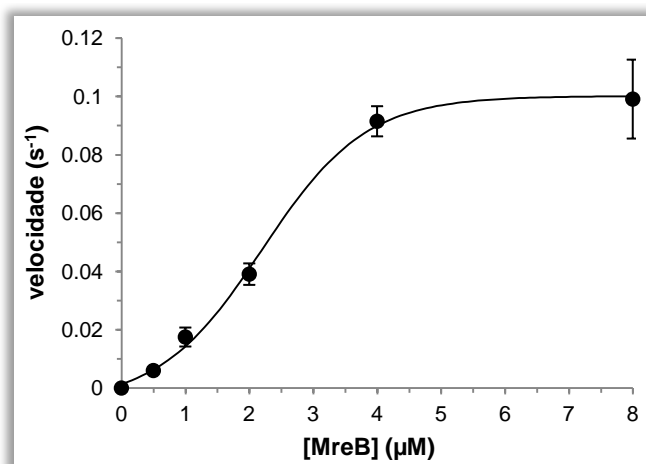
consideravelmente diferente do valor determinado por outros autores. Bean & Amann (2008) determinaram que a concentração crítica para a polimerização da *TmMreB* foi de 0,5  $\mu\text{M}$ . Um ano depois Mayer & Amann (2009) determinaram uma concentração crítica de  $\approx 0,9 \mu\text{M}$  para a *BsMreB*, independentemente da presença ou ausência de nucleótidos<sup>17</sup> e, posteriormente, Popp *et al.* (2010) determinaram uma concentração crítica de 1  $\mu\text{M}$  para a polimerização da *TmMreB*<sup>32</sup>. Finalmente, em 2013, Nurse & Mariani, determinaram o valor da concentração crítica mais elevado, até ao momento, para a polimerização da *EcMreB* (1,5  $\mu\text{M}$ )<sup>31</sup>.

A baixa concentração crítica para a polimerização da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* sugere que existe uma afinidade significativamente mais elevada entre os monómeros de MreB e entre o monómero e o filamento de MreB, por comparação com o observado para a actina. Este facto pode explicar o espaçamento longitudinal ligeiramente menor entre monómeros num filamento de MreB (51 Å), quando comparado com a F-actina (55 Å)<sup>16</sup>. A concentração intracelular muito inferior da MreB em bactérias ( $\approx 5,6 \mu\text{M}$ )<sup>15</sup>, em comparação com a da actina em células eucarióticas ( $\leq 550 \mu\text{M}$ )<sup>118,119</sup> pode, de fato, exigir interações mais fortes entre a MreB para desempenhar as suas funções estruturais, quando comparada com a actina em células eucarióticas.



**Figura III.31.** Determinação da concentração crítica da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*. Intensidade da dispersão de luz em função da concentração da MreB, em condições padrão (2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM ATP e 50 mM KCl em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ ), monitorizada a 90° em relação à luz incidente, num espectralfluorímetro com ambos os monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção II.2.4.3. dos Materiais e Métodos.

Para além disso, representaram-se também as velocidades iniciais ( $\text{s}^{-1}$ ) obtidas em função das diferentes concentrações de MreB (Figura III.32.), tendo os dados experimentais obtidos sido ajustados a uma função sigmoideal descrita pela equação  $v = \frac{0,0991}{1 + 10^{(2,4 - [\text{MreB}]) \times 0,625}}$ , onde 0,0991 corresponde à assíntota superior, ou seja, ao valor máximo da velocidade da reação de polimerização da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*, sendo que a concentração da proteína onde a velocidade de polimerização é metade do valor máximo corresponde a 2,4  $\mu\text{M}$ .



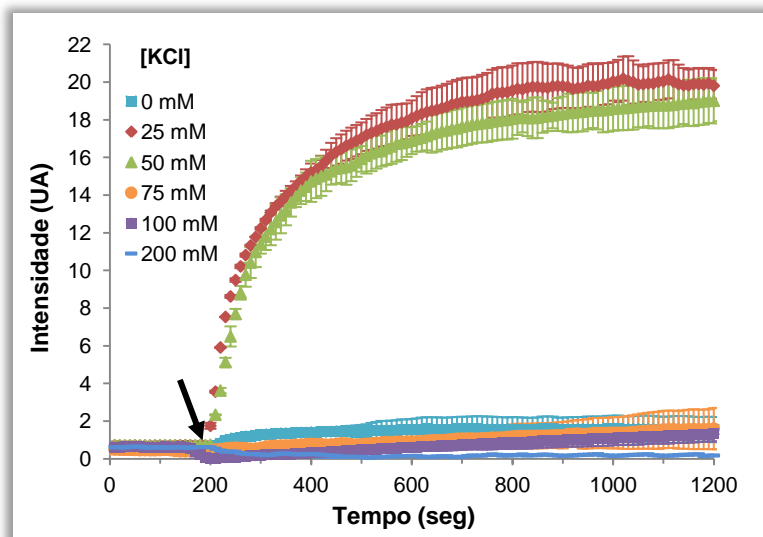
**Figura III.32.** Velocidade de polimerização em função da concentração de MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* em condições padrão (2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP e 50 mM KCl em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>).

Esue *et al.* (2005) analisaram, de igual modo, a formação de filamentos da *TmMreB* em função do tempo e da concentração, compararam à polimerização da F-actina e observaram que, para concentrações  $\geq 1 \mu\text{M}$ , a polimerização da MreB foi muito mais rápida do que a polimerização da actina e a intensidade de dispersão de luz atingiu um patamar em poucos minutos, ou seja, a *TmMreB* demorou, aproximadamente, 15 minutos para atingir o patamar e a actina aproximadamente, 75 minutos. De igual modo, para concentrações  $\geq 1 \mu\text{M}$ , a intensidade da dispersão de luz da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* atingiu um patamar a, aproximadamente, 15 minutos, após a adição de 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP e 50 mM KCl. A intensidade da dispersão de luz no estado estacionário de soluções com a *TmMreB* polimerizada foi, também, significativamente maior que a obtida para soluções de F-actina, para a mesma concentração de proteína.

Mais tarde, em 2008, Bean & Amann, também compararam a intensidade da dispersão de luz pela *TmMreB* polimerizada à da actina muscular e verificaram que, embora cada molécula seja polimerizada num período de tempo mais ou menos semelhante, ou seja, atinja um patamar, aproximadamente após o mesmo tempo de polimerização (aproximadamente, 1000 segundos), a *TmMreB* polimerizada dispersa a luz cerca de 35 vezes mais do que iguais concentrações de actina muscular polimerizada<sup>30</sup>.

Curiosamente, e como foi referido em estudos anteriores<sup>17,30,31</sup>, a polimerização da MreB é modulada negativamente ou inibida para concentrações de K<sup>+</sup> fisiológicas ( $\approx 200 \text{ mM}$ )<sup>120</sup>, o que poderá ser explicado pelo facto da MreB poder adaptar-se de tal modo que o K<sup>+</sup> presente no citoplasma impede a polimerização excessiva, uma vez que a “sobre-polimerização” poderia alterar o equilíbrio com os seus parceiros de interação ou interferir com outros processos celulares<sup>33</sup>.

Posto isto, analisou-se, também, qual o efeito da concentração de KCl na polimerização da MreB, sendo que se optou por usar uma concentração de proteína nos ensaios de 4  $\mu\text{M}$ , uma vez que esta concentração é superior à concentração crítica determinada e à concentração que corresponde a metade da velocidade máxima para a reação de polimerização (Figura III.33.), e relativamente próxima da concentração fisiológica em bactérias (0,2 mg/mL, aproximadamente, 5  $\mu\text{M}$ ).



**Figura III.33.** Dependência da concentração de KCl. Intensidade da dispersão de luz em função do tempo (em segundos) de polimerização da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*, em condições padrão (4  $\mu\text{M}$  MreB em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ ), para diferentes concentrações de KCl. A polimerização foi iniciada pela adição de 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM ATP e 0 – 200 mM KCl, 200 segundos após o início dos ensaios (assinalado com uma seta preta). Os ensaios de dispersão de luz foram monitorizados a 90° em relação à luz incidente, num espectrofluorímetro com ambos os monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção II.2.4.3. dos Materiais e Métodos.

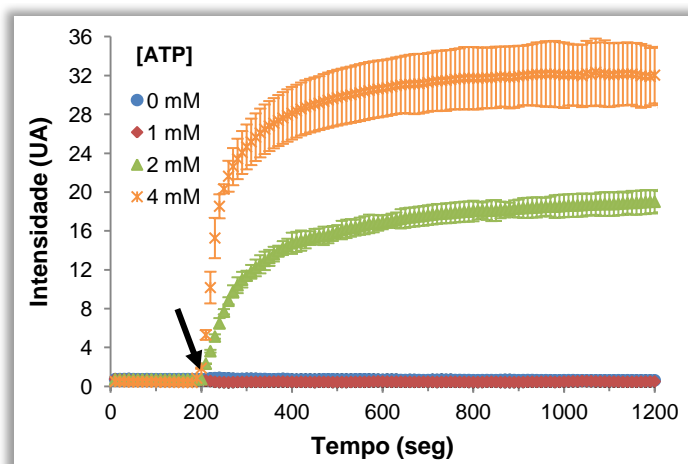
Verificou-se que a reação de polimerização da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* é bastante sensível à concentração deste sal monovalente, uma vez que não polimeriza na ausência de KCl, ao contrário da MreB de outras espécies, nomeadamente, da *BsMreB*<sup>17</sup> e da *EcMreB*, sendo que esta última também é capaz de polimerizar, ainda que, após um período de latência<sup>31</sup>. Verificou-se ainda que as concentrações de KCl entre 75 – 200 mM inibem fortemente a polimerização e que esta reação com 25 e 50 mM KCl é bastante semelhante, podendo ser consideradas concentrações ótimas nas condições utilizadas.

van den Ent *et al.* (2001) e Popp *et al.* (2010) não observaram uma inibição significativa da polimerização da *TmMreB*, enquanto Esue *et al.* (2005) e Bean & Amann (2008) observaram. Popp *et al.* (2010) verificaram que mesmo na presença de 350 mM de KCl a *TmMreB* foi capaz de formar filamentos, enquanto, Bean & Amann (2008), por seu turno, verificaram que concentrações de KCl tão baixas como 75 – 100 mM inibiram fortemente a polimerização e a duração da fase de latência da reação<sup>30</sup>. Da mesma forma, a polimerização da *BsMreB* foi quase inteiramente inibida a 100 mM e o aumento da concentração de KCl de 0

para apenas 10 mM foi suficiente para diminuir a taxa de polimerização em 50%<sup>17</sup>. A taxa de polimerização da *EcMreB* também diminuiu notavelmente a 100 mM KCl e foi muito baixa (próxima de zero) para 200 mM KCl<sup>31</sup>. É de salientar que, embora seja referido que van den Ent *et al.* não observaram uma inibição significativa da polimerização da *TmMreB* e que Esue *et al.* observaram, não está explícito nestes estudos qual a concentração de KCl utilizada.

Uma vez que a polimerização dos filamentos de actina é fortemente promovida por efeitos de aglomeração macromoleculares no citoplasma<sup>121</sup>, a inibição provocada pela presença do sal na polimerização da MreB pode servir para modular a polimerização em células, de modo a permitir o comportamento dinâmico, em vez da polimerização facilitada. Portanto, enquanto as células eucarióticas recorrem ao uso específico da despolimerização da actina e proteínas sequestradoras<sup>119</sup> para evitar a polimerização descontrolada, as bactérias podem, pelo menos em parte, explorar as propriedades físicas do citoplasma diretamente para atingir o mesmo fim<sup>17</sup>.

A polimerização da actina requer ATP e  $Mg^{2+}$  como cofatores, como foi mencionado anteriormente na Introdução (secção I.1.4.). A presença destes dois cofatores favorece cineticamente a formação de uma molécula iniciadora da nucleação para que as subunidades adicionais possam agregar-se para formar um filamento<sup>5</sup>. A MreB, por sua vez, também polimeriza na presença de ATP e  $Mg^{2+}$  e, como já se observou anteriormente noutros estudos, com concentrações críticas próximas da concentração crítica da actina<sup>17,30-32</sup>. No entanto, o papel desses cofatores na polimerização da MreB tem sido menos evidente devido à existência de estudos contraditórios, tal como referido anteriormente. Como tal, no presente estudo analisou-se, também, qual o efeito da concentração de ATP na polimerização da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* e se a mesma polimeriza, ou não, na ausência de nucleótidos (Figura II.34.).



**Figura III.34.** Dependência da concentração de ATP. Intensidade da dispersão de luz em função do tempo (em segundos) de polimerização da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*, em condições padrão (4  $\mu$ M MreB em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ ), para diferentes concentrações de ATP. A polimerização foi iniciada pela adição de 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM KCl e 0 – 4 mM ATP, 200 segundos após o início dos ensaios (assinalado com uma seta preta). Os ensaios de dispersão de luz foram monitorizados a 90° em relação à luz incidente, num espectralfluorímetro com ambos os monocromadores posicionados a 546 nm, de acordo com o descrito na secção II.2.4.3. dos Materiais e Métodos.

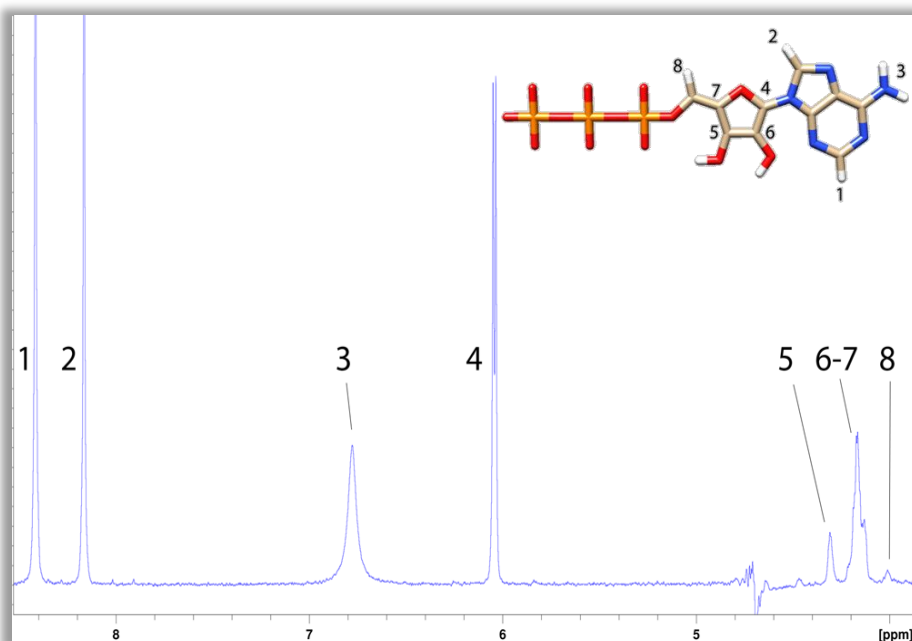
De acordo com este estudo, a MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* não polimeriza na ausência de nucleótidos, nem com 1 mM de ATP, mas a velocidade e extensão da polimerização da MreB são superiores para 4 mM ATP, por comparação com uma concentração de ATP de 2 mM. Estes dados são diferentes dos obtidos num estudo realizado, em 2009, por Mayer & Amann, no qual é referido que a BsMreB não necessita de nucleótidos para polimerizar<sup>17</sup>.

Curiosamente, quando a EcMreB é incubada na ausência de nucleótidos existe um aumento da intensidade da dispersão de luz, atingindo-se praticamente o mesmo valor da extensão observada na presença de ATP, após uma longa fase de latência<sup>31</sup>, ou seja, embora as velocidades sejam diferentes, na presença ou ausência de ATP, a extensão é praticamente idêntica após algum tempo de adaptação às condições utilizadas.

Os dados acima apresentados permitem concluir que, de facto, existe uma grande diversidade nas características da proteína MreB de diferentes espécies, nomeadamente no que diz respeito à reação de polimerização, o que pode ser explicado pela grande diversidade dos meios onde estas bactérias se encontram, o que fará com que haja uma necessidade de adaptação às condições envolventes.

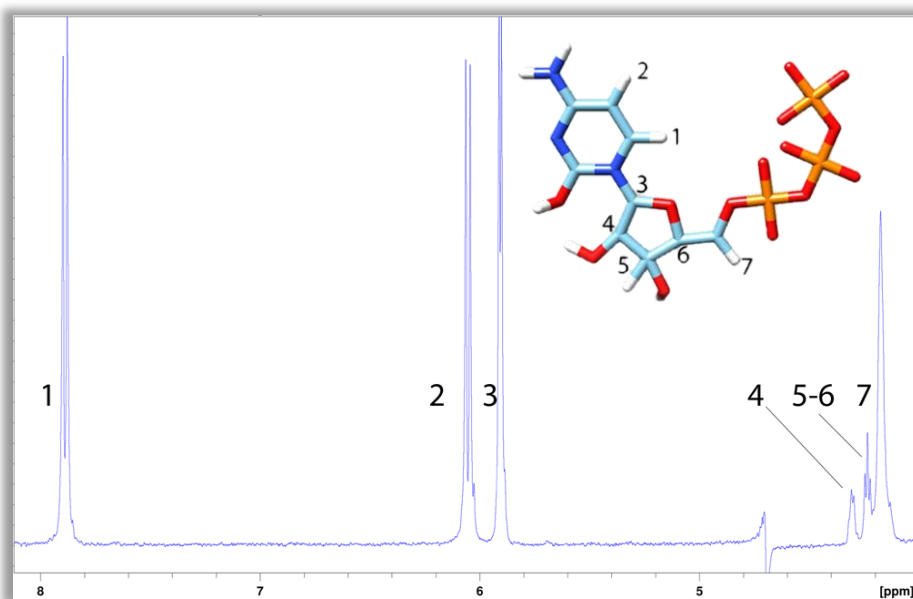
### III.3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Para caracterizar o local de ligação dos nucleótidos da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* realizaram-se ensaios de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear na ausência e na presença de diferentes nucleótidos (ATP, CTP e GTP) em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$  e os espectros obtidos foram processados através do programa *TOPSPIN 2.0* (Bruker). Nas Figuras III.35., III.36. e III.37. estão representados os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN da molécula de ATP, CTP e GTP, respetivamente, e como se pode observar as ressonâncias significativas correspondem aos prótons do grupo  $-\text{NH}_2$  do anel de pirimidina (ATP e GTP) e da base azotada, em todos os casos (ATP, CTP e GTP).

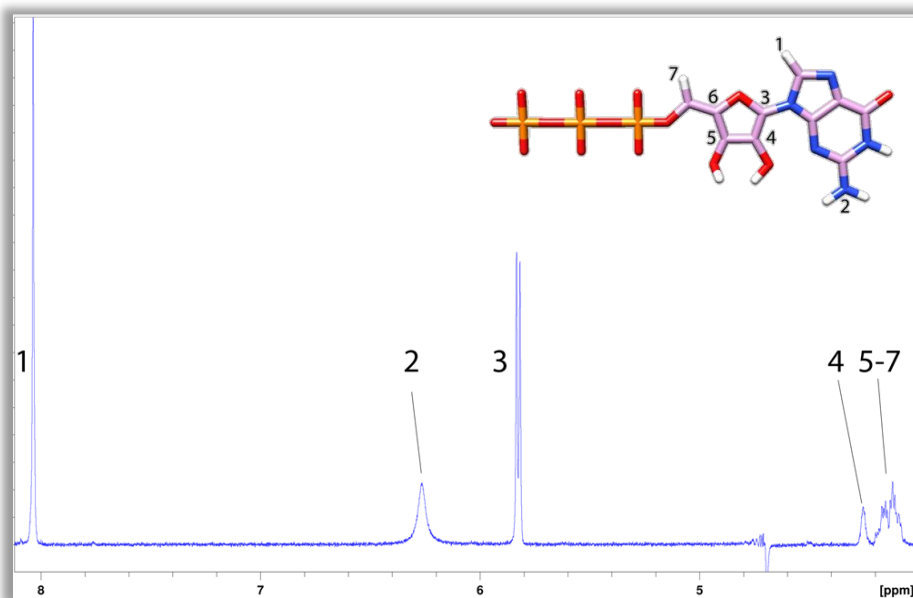


**Figura III.35.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da molécula de ATP (Adenosina-5'-Trifosfato) em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ . A atribuição de ressonâncias encontra-se de acordo com o descrito na base de dados *SDBS* (*Spectral Database for Organic Compounds*). No *inset* encontra-se representada a molécula de ATP com indicação dos prótons que correspondem às ressonâncias atribuídas no espectro. Os espectros foram adquiridos a 25 °C num espectrómetro *Bruker Avance III* 400 MHz equipado com uma unidade de controlo da temperatura. Acumularam-se 16 *scans* por espectro, com um tempo de espera de 1,5 s entre *scans*, de acordo com o descrito na secção II.2.4.4. dos Materiais e Métodos.





**Figura III.36.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN da molécula de CTP (Citosina-5'-Trifosfato) em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>. A atribuição de ressonâncias encontra-se de acordo com o descrito na base de dados *SDBS* (*Spectral Database for Organic Compounds*). No *inset* encontra-se representada a molécula de CTP com indicação dos prótons que correspondem às ressonâncias atribuídas no espectro. Os espectros foram adquiridos a 25 °C num espectrômetro *Bruker Avance III* 400 MHz equipado com uma unidade de controlo da temperatura. Acumularam-se 16 *scans* por espectro, com um tempo de espera de 1,5 s entre *scans*, de acordo com o descrito na secção II.2.4.4. dos Materiais e Métodos.

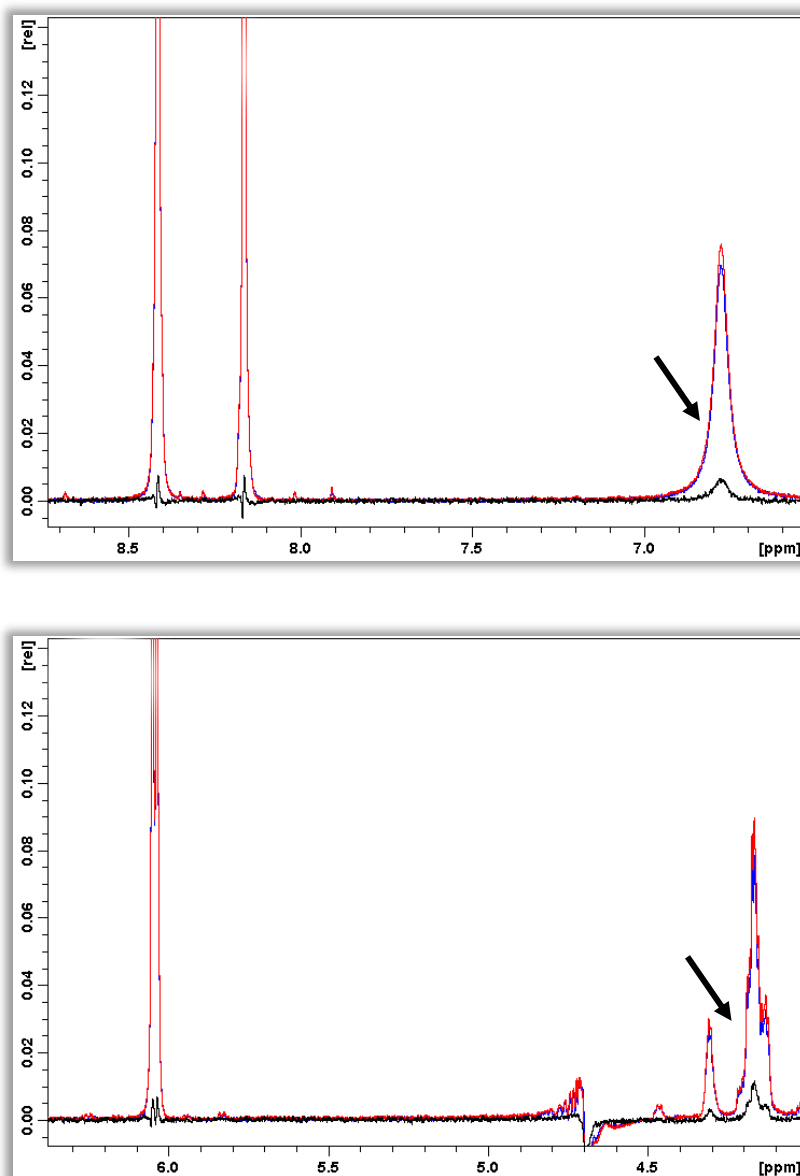


**Figura III.37.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN da molécula de GTP (Guanosina-5'-Trifosfato) em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>. A atribuição de ressonâncias encontra-se de acordo com o descrito na base de dados *SDBS* (*Spectral Database for Organic Compounds*). No *inset* encontra-se representada a molécula de GTP com indicação dos prótons que correspondem às ressonâncias atribuídas no espectro. Os espectros foram adquiridos a 25 °C num espectrômetro *Bruker Avance III* 400 MHz equipado com uma unidade de controlo da temperatura. Acumularam-se 16 *scans* por espectro, com um tempo de espera de 1,5 s entre *scans*, de acordo com o descrito na secção II.2.4.4. dos Materiais e Métodos.

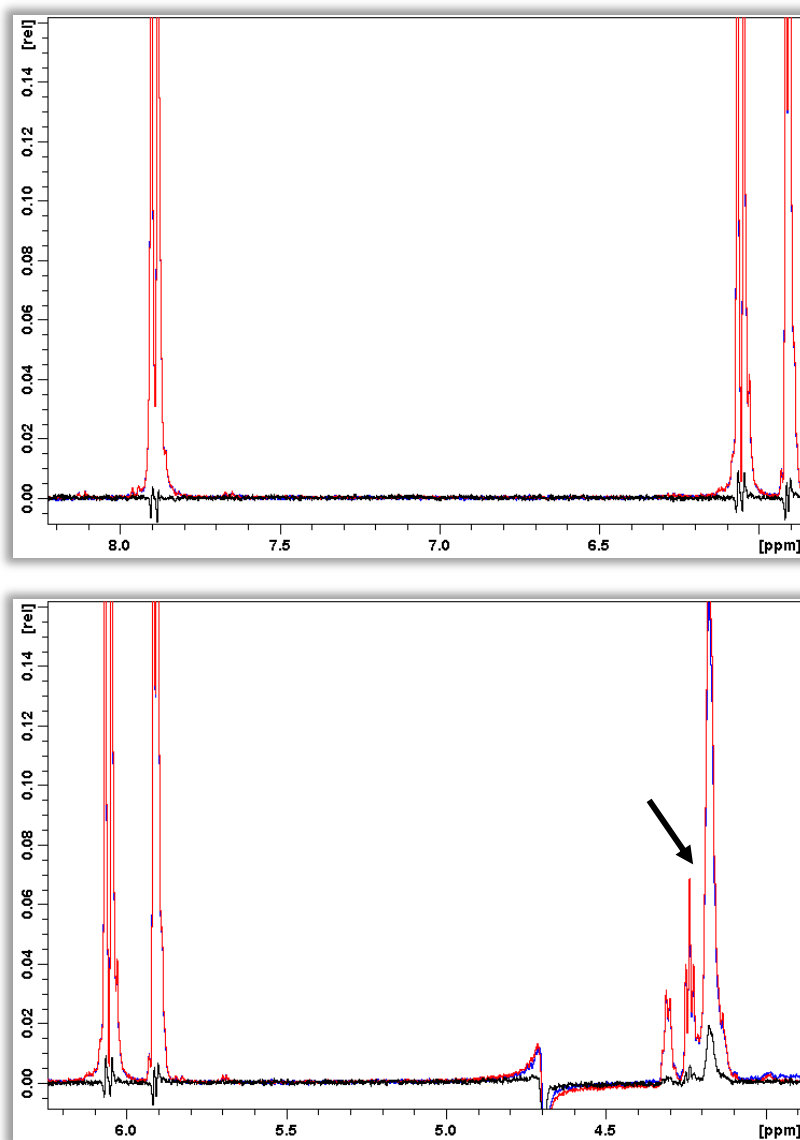
Nas Figuras III.38., III.39. e III.40. estão representados os espectros de RMN-STD da molécula de ATP, CTP e GTP, respetivamente, em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>. O espectro que fornece a informação necessária para determinar o modo de interação ligando-proteína é o espectro da diferença, que corresponde apenas aos sinais do ligando que receberam a transferência de saturação da proteína (a preto), e que é determinado através da diferença entre o espectro *off-resonance* (proteína ligada ao ligando sem saturação, a vermelho) e o espectro *on-resonance* (proteína ligada ao ligando saturada seletivamente, a azul). Os sinais de igual intensidade no espectro de *on-resonance* e de *off-resonance*, não aparecem no espectro da diferença. Posto isto, é possível concluir que, o efeito RMN-STD é predominante na ressonância entre os 7 e os 6 ppm no caso do ATP e do GTP, e na ressonância próxima dos 4 ppm para todos os nucleótidos utilizados nos ensaios (ATP, CTP e GTP).

Desta forma, associando os dados obtidos através dos espectros de <sup>1</sup>H-RMN com os dados obtidos por RMN-STD da molécula de ATP, CTP e GTP, foi possível determinar que o modo de interação do ATP e do GTP com a MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* no local de ligação de nucleótidos é semelhante, adotando estes uma conformação tal que se ligam à proteína através do grupo -NH<sub>2</sub> do anel de pirimidina e da pentose, ao contrário do CTP, que se liga apenas através da pentose.

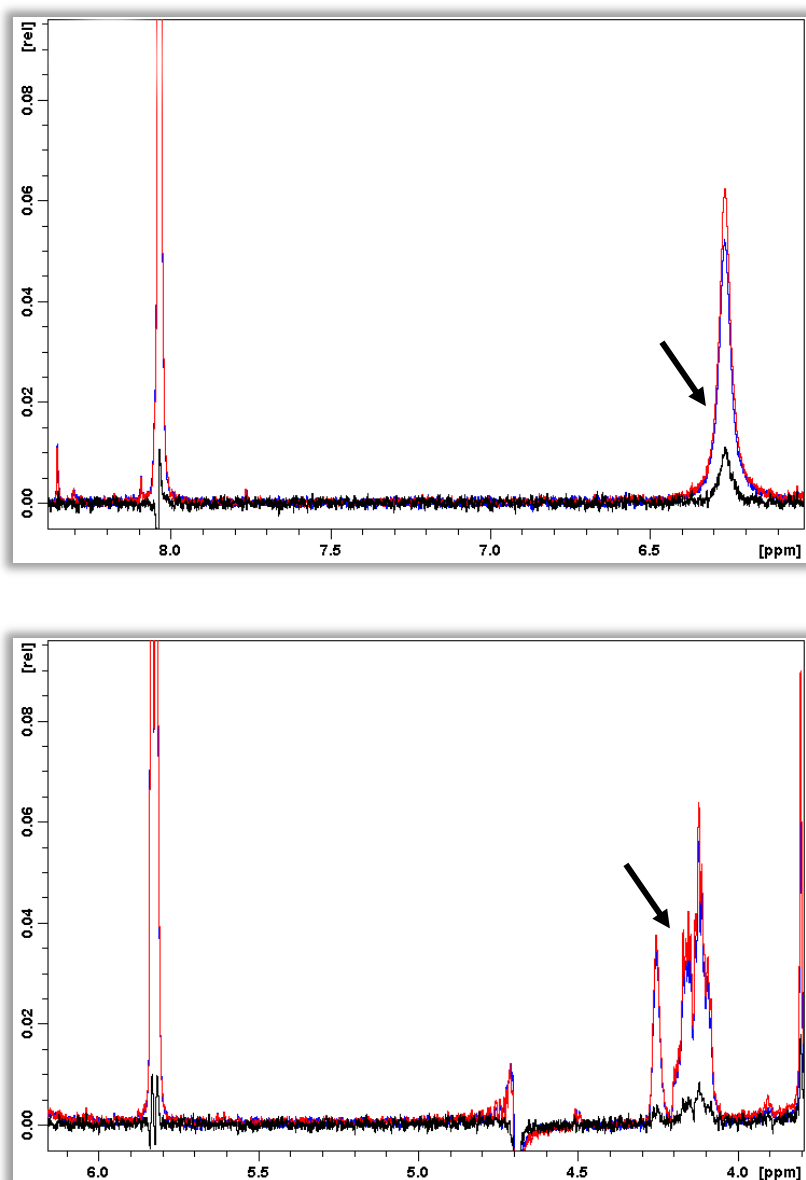
Uma vez que não havia sido determinado o modo de interação dos nucleótidos com a MreB de outras bactérias não foi possível comparar os dados obtidos com os de outros organismos.



**Figura III.38.** Espectro de RMN-STD da molécula de ATP em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ . A azul está representado o espectro *on-resonance*, a vermelho o espectro *off-resonance* e a preto o espectro da diferença. A razão  $[\text{ATP}]/[\text{MreB}]$  é igual a 1000. No espectro estão indicadas com uma seta preta as ressonâncias que sofreram maior efeito de RMN-STD. Os dados de RMN-STD foram adquiridos a 25 °C num espectrómetro *Bruker Avance III* 400 MHz equipado com uma unidade de controlo da temperatura, tendo-se acumulado 16 *scans* por espectro. A saturação foi conseguida através da aplicação de uma série de pulsos Gaussianos de 90° com a frequência especificada (2,94 ppm, *on-resonance* ou 25 ppm, *off-resonance*) com uma duração total de 2 segundos, de acordo com o descrito na secção II.2.4.5. dos Materiais e Métodos.



**Figura III.39.** Espectro de RMN-STD da molécula de CTP em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>. A azul está representado o espectro *on-resonance*, a vermelho o espectro *off-resonance* e a preto o espectro da diferença. A razão [CTP]/[MreB] é igual a 1000. No espectro está indicada com uma seta a ressonância que sofreu maior efeito de RMN-STD. A saturação foi conseguida através da aplicação de uma série de pulsos Gaussianos de 90° com a frequência especificada (2,94 ppm, *on-resonance* ou 25 ppm, *off-resonance*) com uma duração total de 2 segundos, de acordo com o descrito na secção II.2.4.5. dos Materiais e Métodos.



**Figura III.40.** Espectro de RMN-STD da molécula de GTP em 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ . A azul está representado o espectro *on-resonance*, a vermelho o espectro *off-resonance* e a preto o espectro da diferença. A razão  $[\text{GTP}]/[\text{MreB}]$  é igual a 1000. No espectro estão indicadas com uma seta as ressonâncias que sofreram maior efeito de RMN-STD. A saturação foi conseguida através da aplicação de uma série de pulsos Gaussianos de  $90^\circ$  com a frequência especificada (2,94 ppm, *on-resonance* ou 25 ppm, *off-resonance*) com uma duração total de 2 segundos, de acordo com o descrito na secção II.2.4.5. dos Materiais e Métodos.



## Capítulo IV Conclusões e Perspetivas Futuras

Neste trabalho realizou-se a amplificação bem sucedida do gene que codifica a proteína MreB de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, clonando-o, de seguida, no vetor de expressão pET-22b(+) para se efetuar a sobre-expressão desta. Após tratamento e análise da sequência verificou-se que a obtida neste trabalho era idêntica à depositada na base de dados (*National Center for Biotechnology Information – NCBI*).

Após a realização dos testes de expressão, concluiu-se que as condições ótimas de crescimento ocorrem quando a indução é efetuada a uma densidade ótica ao comprimento de onda 600 nm de, aproximadamente, 0,6 ( $D.O_{600\text{ nm}} \approx 0,6$ ), utilizando-se uma concentração de IPTG de 0,5 mM e a temperatura de 37 °C, a 190 rpm.

As técnicas de purificação utilizadas (centrifugações diferenciais e cromatografia de troca aniônica e de filtração em gel) mostraram-se eficazes na remoção de contaminantes proteicos em solução, sendo que a MreB é a proteína existente em maior quantidade na fração final, utilizada nos estudos subsequentes.

Relativamente à caracterização bioquímica da MreB, determinou-se a massa molecular da proteína por cromatografia de filtração em gel e através do gel de SDS-PAGE (aproximadamente  $48 \pm 10$  kDa e 42,5 kDa, respetivamente), e verificou-se que estes valores são ligeiramente mais elevados que o valor calculado teoricamente a partir da sequência em resíduos de aminoácidos, utilizando a ferramenta *ProtParam (ExPASy)* (37 kDa). Como tal, sugere-se que a massa molecular da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* deverá ser, no futuro, determinada por espetrometria de massa, uma vez que esta técnica é muito mais precisa relativamente às técnicas utilizadas e poderá facultar um valor mais aproximado do valor calculado teoricamente. Determinou-se, também, experimentalmente o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{280\text{ nm}} = 27\,900\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) e verificou-se que é superior ao valor teórico estimado a partir da sequência em resíduos de aminoácidos, utilizando a ferramenta *ProtParam (ExPASy)*,  $7\,575\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , provavelmente devido à presença de alguns contaminantes proteicos presentes, ainda, em solução.

Para determinar se a MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* teria a mesma capacidade de polimerizar que a sua homóloga, a actina eucariótica, recorreu-se à técnica de dispersão de luz e os dados estruturais obtidos indicaram que a intensidade do estado estacionário (patamar) dependente linearmente da concentração de MreB. Um ajuste linear da intensidade dependente da concentração indicou uma concentração crítica de  $\approx 3\text{ nM}$  para a MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*, sendo este um valor idêntico ao determinado por Esue *et al.* (2005) para a *TmMreB*. Uma análise semelhante para a actina sugeriu uma concentração crítica de aproximadamente,  $0,25\text{ }\mu\text{M}^{117}$ , ou seja, a concentração crítica da MreB de *M.*

*hydrocarbonoclasticus* é, aproximadamente, 100 vezes inferior à da actina. Verificou-se, ainda, que a velocidade de polimerização da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* se ajusta a uma função sigmoideal descrita pela equação  $v = \frac{0,0991}{1+10^{(2,4-[MreB]) \times 0,625}}$ .

Ainda em relação à caracterização estrutural verificou-se que a reação de polimerização da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* é bastante sensível à concentração do sal monovalente (KCl), uma vez que não polimerizou na ausência do mesmo, sendo que as concentrações de KCl entre 75 – 200 mM inibiram fortemente a polimerização, analogamente aos dados obtidos por Bean e Amann (2008) para a *TmMreB*. Verificou-se, ainda, que a MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* não polimeriza na ausência de nucleótidos, ao contrário da MreB de outras espécies, nomeadamente, a *BsMreB*<sup>17</sup> e a *EcMreB*, sendo que esta última também é capaz de polimerizar, ainda que, após um período de latência<sup>31</sup> e que, a reação de polimerização da MreB da *M. hydrocarbonoclasticus* com 25 e 50 mM KCl é bastante semelhante, podendo ser consideradas concentrações ótimas nas condições utilizadas.

Como trabalho futuro, relativamente à caracterização estrutural, deveriam ser realizados ensaios de polimerização na presença de diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub> ou até mesmo de CaCl<sub>2</sub>, de modo a verificar qual a influência de catiões divalentes na polimerização da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*, uma vez que se sabe que estes catiões têm influência tanto na polimerização da actina como da MreB de outros organismos<sup>17,20,30,32</sup>. Tendo em conta que a MreB de outras bactérias é dependente da temperatura<sup>17,20,30,32</sup> e do pH<sup>17,30,32</sup> para polimerizar e, em alguns casos, também dos nucleótidos<sup>30,31</sup>, deveriam ser também testadas todas estas condições, bem como, a atividade ATPásica da MreB por produção do fosfato inorgânico e, por fim, analisar a troca de ATP no local de ligação de nucleótidos utilizando o ε-ATP e comparar todos estes dados com os reportados para a actina.

Para caracterizar o local de ligação dos nucleótidos da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus* realizaram-se ensaios de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear na ausência e na presença de diferentes nucleótidos; determinou-se que o modo de interação do ATP e GTP com a proteína no local de ligação de nucleótidos é semelhante, adotando estes uma conformação tal que se ligam através da pentose e do grupo –NH<sub>2</sub> do anel de pirimidina, ao contrário do CTP, que se liga apenas através da pentose. Para complementar estes dados, de modo a que fosse possível calcular a constante de dissociação (K<sub>D</sub>) do complexo ligando-proteína, seria necessário realizar uma titulação RMN-STD com diferentes concentrações de ligando-proteína. Para determinar o papel do grupo trifosfato na ligação dos nucleótidos à proteína, também se poderia recorrer à espectroscopia de <sup>31</sup>P-RMN.

Num trabalho futuro, seria, também, interessante realizar um crescimento da *M. hydrocarbonoclasticus* e a purificação da MreB nativa desta bactéria para comparar com os resultados obtidos para esta proteína sobre-expressa heterologicamente, bem como a realização de experiências *in vivo* com proteínas de fusão, nomeadamente a proteína verde fluorescente, muito útil em estudos de microscopia de fluorescência, de modo a analisar a localização e a dinâmica dos filamentos da MreB de *M. hydrocarbonoclasticus*.



## Referências Bibliográficas

1. Dominguez, R. & Holmes, K. C. Actin structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* **40**, 169–86 (2011).
2. Pollard, T. D. & Cooper, J. A. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* **326**, 1208–12 (2009).
3. Korn, E. D., Carlier, M. F. & Pantaloni, D. Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* **238**, 638–44 (1987).
4. Kabsch, W. & Holmes, K. C. The actin fold. *FASEB J.* **9**, 167–74 (1995).
5. Sheterline, P., Clayton, J. & Sparrow, J. Actin. *Protein Profile* **2**, 1–103 (1995).
6. Cooper, J. A. & Schafer, D. A. Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 97–103 (2000).
7. Schmidt, A. & Hall, M. N. Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 305–38 (1998).
8. Maciver, S. K., Zot, H. G. & Pollard, T. D. Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell Biol.* **115**, 1611–20 (1991).
9. Derman, A. I. *et al.* Phylogenetic analysis identifies many uncharacterized actin-like proteins (Alps) in bacteria: regulated polymerization, dynamic instability and treadmilling in Alp7A. *Mol. Microbiol.* **73**, 534–52 (2009).
10. Daniel, R. a & Errington, J. Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* **113**, 767–76 (2003).
11. Shaevitz, J. W. & Gitai, Z. The structure and function of bacterial actin homologs. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000364 (2010).
12. Doi, M. *et al.* Determinations of the DNA sequence of the mreB gene and of the gene products of the mre region that function in formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **170**, 4619–24 (1988).
13. Wachi, M. *et al.* Mutant isolation and molecular cloning of mre genes, which determine cell shape, sensitivity to mecillinam, and amount of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 4935–40 (1987).
14. Wachi, M. & Matsushashi, M. Negative control of cell division by mreB, a gene that functions in determining the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **171**, 3123–7 (1989).
15. Jones, L. J., Carballido-López, R. & Errington, J. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**, 913–22 (2001).
16. Van den Ent, F., Amos, L. a & Löwe, J. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**, 39–44 (2001).

## Referências Bibliográficas

---

17. Mayer, J. A. & Amann, K. J. Assembly properties of the *Bacillus subtilis* actin, MreB. *Cell Motil. Cytoskeleton* **66**, 109–18 (2009).
18. Gaballah, A., Kloeckner, A., Otten, C., Sahl, H.-G. & Henrichfreise, B. Functional analysis of the cytoskeleton protein MreB from *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One* **6**, e25129 (2011).
19. Kruse, T., Møller-Jensen, J., Løbner-Olesen, A. & Gerdes, K. Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **22**, 5283–92 (2003).
20. Esue, O., Cordero, M., Wirtz, D. & Tseng, Y. The assembly of MreB, a prokaryotic homolog of actin. *J. Biol. Chem.* **280**, 2628–35 (2005).
21. Bork, P., Sander, C. & Valencia, A. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 7290–7294 (1992).
22. Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F. & Holmes, K. C. Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**, 37–44 (1990).
23. Shih, Y.-L., Le, T. & Rothfield, L. Division site selection in *Escherichia coli* involves dynamic redistribution of Min proteins within coiled structures that extend between the two cell poles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 7865–70 (2003).
24. Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Yamaguchi, Y. & Inouye, M. A novel membrane-bound toxin for cell division, CptA (YgfX), inhibits polymerization of cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB, in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **328**, 174–81 (2012).
25. Mohammadi, T. *et al.* The essential peptidoglycan glycosyltransferase MurG forms a complex with proteins involved in lateral envelope growth as well as with proteins involved in cell division in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **65**, 1106–21 (2007).
26. Van den Ent, F., Møller-Jensen, J., Amos, L. a, Gerdes, K. & Löwe, J. F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *EMBO J.* **21**, 6935–43 (2002).
27. Becker, E. *et al.* DNA segregation by the bacterial actin AlfA during *Bacillus subtilis* growth and development. *EMBO J.* **25**, 5919–31 (2006).
28. Carballido-López, R. The bacterial actin-like cytoskeleton. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 888–909 (2006).
29. Errington, J. The bacterial actin cytoskeleton. *ASM News* **69**, 608–614 (2003).
30. Bean, G. J. & Amann, K. J. Polymerization Properties of the *Thermotoga maritima* Actin MreB : Roles of Temperature, Nucleotides, and Ions. *Biochemistry* **47**, 826–835 (2008).
31. Nurse, P. & Mariani, K. J. Purification and characterization of *Escherichia coli* MreB protein. *J. Biol. Chem.* **288**, 3469–75 (2013).
32. Popp, D. *et al.* Filament structure, organization, and dynamics in MreB sheets. *J. Biol. Chem.* **285**, 15858–65 (2010).
33. Ozyamak, E., Kollman, J. M. & Komeili, A. Bacterial actins and their diversity. *Biochemistry* **52**, 6928–39 (2013).
34. Gayathri, P., Fujii, T., Namba, K. & Löwe, J. Structure of the ParM filament at 8.5Å resolution. *J. Struct. Biol.* **184**, 33–42 (2013).

35. Popp, D. *et al.* Structure and filament dynamics of the pSK41 actin-like ParM protein: implications for plasmid DNA segregation. *J. Biol. Chem.* **285**, 10130–40 (2010).
36. Popp, D. *et al.* Novel actin-like filament structure from *Clostridium tetani*. *J. Biol. Chem.* **287**, 21121–9 (2012).
37. Szwedziak, P., Wang, Q., Freund, S. M. V & Löwe, J. FtsA forms actin-like protofilaments. *EMBO J.* **31**, 2249–60 (2012).
38. Esue, O., Wirtz, D. & Tseng, Y. GTPase activity, structure, and mechanical properties of filaments assembled from bacterial cytoskeleton protein MreB. *J. Bacteriol.* **188**, 968–76 (2006).
39. Booth, I. R. Regulation of Cytoplasmic pH in Bacteria. *Microbiol. Rev.* **49**, 359–378 (1985).
40. Epstein, Wolfgang and Schultz, S. G. Cation Transport in *Escherichia coli* V. Regulation of cation content. *J Gen Physiol.* **49**, 221–234 (1965).
41. Figge, R. M., Divakaruni, A. V & Gober, J. W. MreB , the cell shape-determining bacterial actin homologue , co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* **51**, 1321–1332 (2004).
42. Kruse, T., Bork-Jensen, J. & Gerdes, K. The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. *Mol. Microbiol.* **55**, 78–89 (2005).
43. Divakaruni, A. V, Loo, R. R. O., Xie, Y., Loo, J. a & Gober, J. W. The cell-shape protein MreC interacts with extracytoplasmic proteins including cell wall assembly complexes in *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 18602–7 (2005).
44. Dye, N. A., Pincus, Z., Theriot, J. A., Shapiro, L. & Gitai, Z. Two independent spiral structures control cell shape in *Caulobacter*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 18608–13 (2005).
45. Karczmarek, A. *et al.* DNA and origin region segregation are not affected by the transition from rod to sphere after inhibition of *Escherichia coli* MreB by A22. *Mol. Microbiol.* **65**, 51–63 (2007).
46. Bean, G. J. *et al.* A22 disrupts the bacterial actin cytoskeleton by directly binding and inducing a low-affinity state in MreB. *Biochemistry* **48**, 4852–7 (2009).
47. Van den Ent, F., Izoré, T., Bharat, T. A., Johnson, C. M. & Löwe, J. Bacterial actin MreB forms antiparallel double filaments. *Elife* **3**, e02634 (2014).
48. Levin, P. A., Margolis, P. S., Setlow, P., Losick, R. & Sun, D. Identification of *Bacillus subtilis* genes for septum placement and shape determination. *J. Bacteriol.* **174**, 6717–28 (1992).
49. Lee, J.-C., Cha, J.-H., Zerbv, D. B. & Stewart, G. C. Heterospecific expression of the *Bacillus subtilis* cell shape determination genes mreBCD in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* **47**, 146–52 (2003).
50. Bendezú, F. O. & de Boer, P. a J. Conditional lethality, division defects, membrane involution, and endocytosis in mre and mrd shape mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**, 1792–811 (2008).

## Referências Bibliográficas

---

51. Gitai, Z., Dye, N. & Shapiro, L. An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8643–8 (2004).
52. Gitai, Z., Dye, N. A., Reisenauer, A., Wachi, M. & Shapiro, L. MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. *Cell* **120**, 329–41 (2005).
53. Wagner, J. K., Galvani, C. D. & Brun, Y. V. *Caulobacter crescentus* requires RodA and MreB for stalk synthesis and prevention of ectopic pole formation. *J. Bacteriol.* **187**, 544–53 (2005).
54. Kruse, T. *et al.* Actin homolog MreB and RNA polymerase interact and are both required for chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **20**, 113–24 (2006).
55. Cowles, K. N. & Gitai, Z. Surface association and the MreB cytoskeleton regulate pilus production, localization and function in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **76**, 1411–26 (2010).
56. Kawai, Y., Daniel, R. A. & Errington, J. Regulation of cell wall morphogenesis in *Bacillus subtilis* by recruitment of PBP1 to the MreB helix. *Mol. Microbiol.* **71**, 1131–44 (2009).
57. Van den Ent, F. *et al.* Dimeric structure of the cell shape protein MreC and its functional implications. *Mol. Microbiol.* **62**, 1631–1642 (2006).
58. Van den Ent, F., Johnson, C. M., Persons, L., de Boer, P. & Löwe, J. Bacterial actin MreB assembles in complex with cell shape protein RodZ. *EMBO J.* **29**, 1081–90 (2010).
59. Vats, P., Shih, Y.-L. & Rothfield, L. Assembly of the MreB-associated cytoskeletal ring of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **72**, 170–82 (2009).
60. White, C. L., Kitich, A. & Gober, J. W. Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD. *Mol. Microbiol.* **76**, 616–33 (2010).
61. Domínguez-Escobar, J. *et al.* Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. *Science* **333**, 225–8 (2011).
62. Garner, E. C. *et al.* Coupled, circumferential motions of the cell wall synthesis machinery and MreB filaments in *B. subtilis*. *Science* **333**, 222–5 (2011).
63. Swulius, M. T. *et al.* Long helical filaments are not seen encircling cells in electron cryotomograms of rod-shaped bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **407**, 650–5 (2011).
64. Van Teeffelen, S. *et al.* The bacterial actin MreB rotates, and rotation depends on cell-wall assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 15822–7 (2011).
65. Van Teeffelen, S. & Gitai, Z. Rotate into shape: MreB and bacterial morphogenesis. *EMBO J.* **30**, 4856–7 (2011).
66. Bendezú, F. O., Hale, C. a, Bernhardt, T. G. & de Boer, P. a J. RodZ (YfgA) is required for proper assembly of the MreB actin cytoskeleton and cell shape in *E. coli*. *EMBO J.* **28**, 193–204 (2009).
67. Swulius, M. T. & Jensen, G. J. The helical MreB cytoskeleton in *Escherichia coli* MC1000/pLE7 is an artifact of the N-Terminal yellow fluorescent protein tag. *J. Bacteriol.* **194**, 6382–6 (2012).

- 
68. Carballido-López, R. & Errington, J. The bacterial cytoskeleton: in vivo dynamics of the actin-like protein Mbl of *Bacillus subtilis*. *Dev. Cell* **4**, 19–28 (2003).
69. Slovak, P. M., Wadhams, G. H. & Armitage, J. P. Localization of MreB in *Rhodobacter sphaeroides* under conditions causing changes in cell shape and membrane structure. *J. Bacteriol.* **187**, 54–64 (2005).
70. Vats, P. & Rothfield, L. Duplication and segregation of the actin (MreB) cytoskeleton during the prokaryotic cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 17795–800 (2007).
71. Löwe, J. & Amos, L. a. Evolution of cytomotive filaments: the cytoskeleton from prokaryotes to eukaryotes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 323–9 (2009).
72. White, C. L. & Gober, J. W. MreB: pilot or passenger of cell wall synthesis? *Trends Microbiol.* **20**, 74–9 (2012).
73. Salje, J., van den Ent, F., de Boer, P. & Löwe, J. Direct membrane binding by bacterial actin MreB. *Mol. Cell* **43**, 478–87 (2011).
74. Maeda, Y. T. *et al.* Assembly of MreB filaments on liposome membranes: a synthetic biology approach. *ACS Synth. Biol.* **1**, 53–9 (2012).
75. Polka, J. K., Kollman, J. M., Agard, D. A. & Mullins, R. D. The structure and assembly dynamics of plasmid actin AlfA imply a novel mechanism of DNA segregation. *J. Bacteriol.* **191**, 6219–30 (2009).
76. Rivera, C. R., Kollman, J. M., Polka, J. K., Agard, D. A. & Mullins, R. D. Architecture and assembly of a divergent member of the ParM family of bacterial actin-like proteins. *J. Biol. Chem.* **286**, 14282–90 (2011).
77. Draper, O. *et al.* MamK, a bacterial actin, forms dynamic filaments in vivo that are regulated by the acidic proteins MamJ and LimJ. *Mol. Microbiol.* **82**, 342–54 (2011).
78. Møller-Jensen, J., Jensen, R. B., Löwe, J. & Gerdes, K. Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *EMBO J.* **21**, 3119–27 (2002).
79. Gauthier, M., Christen, R., Fernandez, L. & Acquaviva, M. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a New, Extremely Halotolerant, Hydrocarbon-Degrading Marine Bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 568–576 (1992).
80. Yoon, J.-H., Shin, D.-Y., Kim, I.-G., Kang, K. H. & Park, Y.-H. *Marinobacter litoralis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from sea water from the East Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 563–568 (2003).
81. Larsen, H. Halophilic and halotolerant microorganisms-an overview and historical perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* **39**, 3–7 (1986).
82. Gorshkova, N. M. *Marinobacter excellens* sp. nov., isolated from sediments of the Sea of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 2073–2078 (2003).
83. Márquez, M. C. & Ventosa, A. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* Gauthier et al. 1992 and *Marinobacter aquaeolei* Nguyen et al. 1999 are heterotypic synonyms. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1349–51 (2005).
84. Surhone, L. M., Mariam T. Tennoe & Susan F. Henssonow. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. (Betascript Publishing, 2011).

## Referências Bibliográficas

---

85. Baumann, L., Baumann, P., Mandel, M. & Allen, R. D. Taxonomy of Aerobic Marine Eubacteria. *J. Bacteriol.* **110**, 402–429 (1972).
86. Bonin, P., Gilewicz, M. & Bertrand, J. C. Denitrification by a marine bacterium *Pseudomonas nautica* strain 617. *Ann. Inst. Pasteur. Microbiol.* **138**, 371–83
87. Spröer, C. *et al.* Transfer of *Pseudomonas nautica* to *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 1445–1448 (1998).
88. Grimaud, R. *et al.* Genome sequence of the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, which forms biofilms on hydrophobic organic compounds. *J. Bacteriol.* **194**, 3539–40 (2012).
89. Mount, D. W. *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*. 665 (Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 2004).
90. Schochetman, G., Ou, C.-Y. & Jones, W. K. Polymerase Chain Reaction. *J. Infect. Dis.* **158**, (1988).
91. Corporation, I. SYBR® Safe DNA Gel Stain. (2011).
92. NZYTech. NZYGelpure. (2010).
93. Wei, H., Therrien, C., Blanchard, A., Guan, S. & Zhu, Z. The Fidelity Index provides a systematic quantitation of star activity of DNA restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* **36**, 1–10 (2008).
94. Sambrook, J., Russel, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).
95. Roche. Rapid DNA Ligation Kit. *Roche Appl. Sci.* 1–4 (2004).
96. Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 2172–5 (1989).
97. WARD's Natural Science Establishment. *Glowing Bacteria: Transformation with a Firefly Gene Lab Activity Student Study Guide*. 4–5 (2002).
98. Agrawal, P., Subramanian, R., Tripathi, R., Rautela, M. S. & Kumar, S. A case study of Bioremediation of Contaminated Soil & Waste Water in Upper Assam. (2010).
99. Morrison, D. . Transformation in *Escherichia coli*: Cryogenic Preservation of Competent Cells. *J. Bacteriol.* **132**, (1977).
100. Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60–89 (1990).
101. Corporation, L. T. *One Shot® BL21(DE3) One Shot® BL21(DE3)pLysS One Shot® BL21(DE3)pLysE Competent Cells*. 1–14 (2010).
102. Corporation, I. One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*. (2006).
103. Merck, Kg. NovaBlue GigaSingles™ Competent Cells. (2013).
104. Ausubel, F. M. *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. (John Wiley & Sons, 2004).

105. Quintas, A., Freire, A. P. & Halpern, M. J. *Bioquímica - Organização Molecular da Vida*. (Lidel, 2008).
106. Cooper, J. A. & T. D. P. Methods to measure actin polymerization. *Methods Enzym.* **85**, 182–210 (1982).
107. Errington, J. The Bacterial Actin Cytoskeleton. *ASM News* **69**, 608–614 (2003).
108. Frey, B. & Suppmann, B. Demonstration of the Expand PCR System's greater fidelity and higher yields with a lacI-based fidelity assay. *Biochemica* **2**, 34–35 (1995).
109. Wessner, S. & Rüger, B. Expand Long Range dNTPack Generate PCR Products of 5 kb to 25 kb from Genomic DNA Typical Results Using. **4**, 27–28 (2006).
110. Barnes, W. M. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 2216–20 (1994).
111. Cheng, S., Chang, S. Y., Gravitt, P. & Respass, R. Long PCR. *Nature* **369**, 684–5 (1994).
112. Robinson, C. R. & Sligar, S. G. Changes in solvation during DNA binding and cleavage are critical to altered specificity of the EcoRI endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2186–91 (1998).
113. Amersham, B. Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing. Principles and Methods.
114. Healthcare, G. E. Gel filtration. Principles and Methods.
115. Chou, S. C. & Goldstein, a. Chromogenic groupings in the Lowry protein determination. *Biochem. J.* **75**, 109–15 (1960).
116. Legler, G., Müller-Platz, C. M., Mentges-Hettkamp, M., Pflieger, G. & Jülich, E. On the chemical basis of the Lowry protein determination. *Anal. Biochem.* **150**, 278–87 (1985).
117. Nishida, E. & Sakai, H. Kinetic Analysis of Actin Polymerization. *J. Biochem.* **93**, 1011–1020 (1983).
118. Pollard, T. D. & Cooper, J. A. ACTIN AND ACTIN-BINDING PROTEINS. A CRITICAL EVALUATION OF MECHANISMS AND FUNCTIONS. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 987–1035 (1986).
119. Pollard, T. D., Blanchoin, L. & Mullins, R. D. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 545–76 (2000).
120. Shabala, L. *et al.* Ion transport and osmotic adjustment in Escherichia coli in response to ionic and non-ionic osmotica. *Environ. Microbiol.* **11**, 137–48 (2009).
121. Drenckhahn, D. & Pollard, T. D. Elongation of Actin Filaments is a Diffusion-limited Reaction at the Barbed End and Is Accelerated by Inert Macromolecules. *J. Biol. Chem.* **261**, 12754–12758 (1986).





## Anexos

### Anexo I. Composição dos géis e soluções de eletroforese SDS-PAGE

**Tabela AI.I.** Composição quantitativa dos géis de poli(acrilamida 12,5% (m/V) em solução tampão Tris-Tricina. O Persulfato de amónia (PSA, *Sigma-Aldrich®*) e o TEMED (do inglês, *Tetramethylethylenediamine*, com a fórmula  $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ , *Merk*), são adicionados imediatamente antes de colocar a solução no suporte de vidro, para evitar a polimerização antes da aplicação da solução do gel no local adequado. As soluções para realização de géis são guardadas a 4 °C, à exceção do PSA, que é conservado a -20 °C. O *stock* da mistura de Acrilamida/Bisacrilamida tem uma percentagem diferente para o gel de separação e concentração, 41,5% / 1,5% (m/V) e 48% / 1,5% (m/V), respetivamente.

Componentes	Gel de Separação (12,5%)	Gel de Concentração (4%)
Acrilamida/Bisacrilamida	1,1 mL	0,2 mL
Tampão do gel	1,4 mL	0,6 mL
Glicerol 100%	0,7 mL	-
Água Milli-Q	1 mL	1,6 mL
PSA 10%	35 µL	16 µL
TEMED	3,5 µL	2,4 µL

**Tabela AI.II.** Composição quantitativa da solução aquosa do tampão de amostras para eletroforese SDS-PAGE. Os volumes apresentados são para um  $V_{\text{total}}$  de 20 mL.

Componentes	Quantidade
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	5 mL
SDS 10%	8 mL
β-Mercaptoetanol	1 mL
Glicerol	2 mL
Azul Bromofenol	4 mg

**Tabela AI.III.** Composição quantitativa da solução corante para géis de SDS-PAGE.  $V_{\text{final}} = 250$  mL (em  $\text{H}_2\text{O}$ ).

Componentes	Volume (mL)
Azul Coomassie R-250	5 mL
Ácido Acético Glacial	8 mL
Metanol	1 mL

## Anexo II. Reagente de Biureto (Método de *Lowry*)

**Tabela AII.I.** Composição e modo de preparação da solução do reagente de Biureto para o método de quantificação da proteína através do método de *Lowry*.

Preparação (500 mL)	
1	Dissolver 0,75 g de sulfato de cobre (II) ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) mais 3 g de tartarato de sódio e potássio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) em 250 mL de água destilada
2	Dissolver 15 g de NaOH em 100 mL de água destilada
3	Juntar a solução preparada no passo 1 à solução preparada no passo 2
4	Adicionar 0,5 g de iodeto de potássio (KI) e perfazer até 500 mL com água destilada